

**EINFLUSS VON KOKARZINOGENEN UND
VIRUSTRANSFORMATION
AUF DIE AUSBILDUNG DER
EXTRAZELLULÄREN MATRIX VON
KNORPEL- UND MUSKELZELLEN**

Joachim Sasse

1981

EINFLUSS VON KOKARZINOGENEN UND VIRUSTRANSFORMATION AUF DIE AUSBILDUNG

DER EXTRAZELLULÄREN MATRIX VON KNORPEL- UND MUSKELZELLEN

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

des Fachbereiches Chemie / Pharmazie der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Joachim Sasse aus Berlin

Januar 1981

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Klaus Kühn
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Guido Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Februar 1981



Meiner Familie

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München, in der Abteilung für Bindegewebforschung durchgeführt.

Herrn Prof. Klaus Kühn danke ich für die wohlwollende Unterstützung und Förderung.

Herrn Dr. Klaus von der Mark gilt mein Dank für die Betreuung dieser Arbeit, für wertvolle Anregungen, Ratschläge und Diskussionen.

Frau Dr. Waltraud Dessau, Frau Dr. Helga von der Mark und Herrn Dr. Rupert Timpl möchte ich für die freundliche Überlassung der Antikörper besonders danken.

Frau Lieselotte Sieweck danke ich für die Assistenz am Gefriermikrotom, Frau Magdalena de Lorenzo für die Durchführung der Ionenaustauscher-Chromatographien.

Danken möchte ich auch allen Kollegen in der Abteilung, die mir mit experimenteller Erfahrung und Kritik geholfen haben.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ABKÜRZUNGEN	
EINLEITUNG	1
AUFGABENSTELLUNG	8
ERGEBNISSE	10
A) DAS EXTRAZELLULÄRE PROTEINMUSTER VON KNORPELZELLEN	10
I. Veränderungen des extrazellulären Proteinmusters während der Knorpeldifferenzierung.	10
1. Die Knorpeldifferenzierung von Mesenchymzellen.	14
2. Der Einfluß eines Kokarzinogens auf die Knorpeldifferenzierung.	29
II. Das extrazelluläre Proteinmuster von differenzierten Knorpelzellen.	41
1. Differenzierte Knorpelzellen.	42
2. Der Einfluß eines Kokarzinogens auf differenzierte Knorpelzellen.	48
3. Der Einfluß von Virustransformation auf differenzierte Knorpelzellen.	72
B) DAS EXTRAZELLULÄRE PROTEINMUSTER VON MUSKELZELLEN	94
I. Veränderungen des extrazellulären Proteinmusters während der Muskeldifferenzierung.	94
II. Der Einfluß eines Kokarzinogens auf die Muskel- differenzierung.	108
III. Der Einfluß von Virustransformation auf die Muskeldifferenzierung.	110
ZUSAMMENFASSENDE BETRACHTUNG	120
EXPERIMENTELLER TEIL	126
LITERATURVERZEICHNIS	146
ZUSAMMENFASSUNG	165
ANHANG	

ABKÜRZUNGEN

APN	- β - Aminopropionitril
BSA	- Rinderserumalbumin
CM-Cellulose	- Carboxymethylcellulose
CMFS	- Ca, Mg- freie Saline
DTE	- Dithioerythrit
DMSO	- Dimethylsulfoxyd
EDTA	- Äthylendiamintetraazetat
FCS	- Fötales Kälberserum
FITC	- Fluoresceinisothiocyanat
GAG	- Glykosaminoglykan
Hyp	- Hydroxyprolin
NEM	- N - Äthylmaleimid
PBS	- Phosphatgepufferte Saline
PMSF	- Phenylmethansulfonylfluorid
POPOP	- 1,4-bis-2-(5-Phenylloxazolyl)- Benzol
PPO	- 2,5-Diphenylloxazol
Pro	- Prolin
SDS	- Natriumdodecylsulfat
TBS	- Trisgepufferte Saline
TCA	- Trichloressigsäure
Tris	- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

EINLEITUNG

Bindegewebe ist in den mannigfaltigsten Formen im menschlichen und tierischen Körper weit verbreitet. Hierzu gehören nicht nur die Struktur von Knochen und Knorpel, sondern auch die festen Hüllen, welche die Organe umgeben. Die Funktion dieser Gewebe ist vielfältig. Das Knochengerüst gibt dem Tier eine feste Form; Sehnen vermitteln die durch Muskeltätigkeit bewerkstelligten Bewegungen. Der elastische Knorpel besitzt stoßdämpfende Eigenschaften; die Haut umhüllt den Körper und übt eine Schutzfunktion aus.

Charakteristisch für die Bindegewebe ist die reichlich ausgebildete, von Bindegewebszellen produzierte Interzellulärsubstanz = extrazelluläre Matrix (ECM). Diese besteht aus einer amorphen Grundsubstanz (Proteoglykane), in die Eiweißfibrillen (z.Bsp. Kollagen, Glykoproteine) eingelagert sind.

Kollagen ist das häufigste Strukturprotein - es hat einen Anteil von mehr als einem Drittel am Gesamtprotein des Tierkörpers. Grundbaustein der Kollagenfibrillen ist das Kollagenmolekül mit einem Molekulargewicht von etwa 300 000. Das stäbchenförmige Molekül hat eine Länge von 2900 Å und einen Durchmesser von nur 14 Å. Es besteht aus drei Untereinheiten, den α -Ketten, mit etwa 1050 Aminosäureresten. Je drei α -Ketten sind zu einer rechtsgängigen Tripelhelix verdreht (Abb. 1).

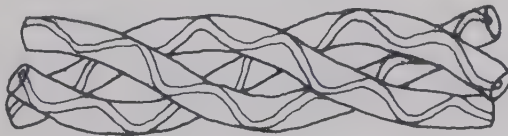


Abb. 1: Tripelhelixstruktur des Kollagenmoleküls.

(aus Timpl, 1977; zur Übersicht, siehe Kühn, 1969)
Drei α -Ketten sind in der Form einer rechtsgängigen Superspirale (Tripelhelix) umeinandergewunden. Die Anordnung der Aminosäuren in den α -Ketten erfolgt in einer linksgängigen Spirale.

In den letzten Jahren wurden eine Reihe von strukturbildenden und kontrahilen Proteinen in mehreren, genetisch unterschiedlichen Typen aufgefunden. Hierzu gehören z.Bsp. Aktin, Myosin, Troponin und Desmin. Beim Kollagen wurden bisher fünf genetische Varianten näher charakterisiert (Tab. 1; vergl. Miller, 1976), und das Vorkommen von weiteren fünf α -Ketten beschrieben (Little und Church, 1978; Sage und Bornstein, 1979; Burgeson und Hollister, 1979). Die einzelnen Kollagentypen unterscheiden sich voneinander in der Aminosäuresequenz: Verschiedene Gene kodieren für die einzelnen Polypeptidketten.

Tab. 1: Genetische Varianten des Kollagens

Kollagentyp	Kettenzusammensetzung	Hauptsächliches Vorkommen
I	$[\alpha_1 (I)]_2 \alpha_2$	Haut, Knochen, Sehnen, Gefäße, Mesenchym, Dentin
II	$[\alpha_1 (II)]_3$	Elastischer und hyaliner Knorpel
III	$[\alpha_1 (III)]_3$	Haut, Gefäße, retikuläres Gewebe, Mesenchym
IV	$[\alpha_1 (IV)]_3$	Basalmembran
V	AB_2	Plazenta, Muskel, Knochen, Haut

Kollagen wird in der Bindegewebszelle in Form eines Vorläufes, dem Prokollagen, synthetisiert (zur Übersicht, siehe Fessler und Fessler, 1978), dessen pro- α - Ketten zusätzliche Peptide am amino- und carboxyterminalen Ende besitzen. Nach Sekretion des Prokollagens in den extrazellulären Raum werden die N- und C-terminalen Extensionspeptide abgespalten, und die Kollagenmoleküle zu Fibrillen zusammengelagert. Typ I Kollagen bildet dabei dicht gepackte, parallel verlaufende Fibrillen aus; die des Typ II Kollagens sind dagegen dünn und unregelmäßig angeordnet. Die besonders dünnen Fibrillen des Typ III Kollagens sind Bausteine des feinen, retikulären Gitterfasernetzes.

Proteoglykane sind komplexe Strukturen aus hochmolekularen Zuckerpolymeren (Glykosaminoglykanen) mit Proteinen. Die Abb. 2 zeigt den Aufbau des gut untersuchten Proteoglykan - Aggregates aus Knorpel. Zahlreiche Proteoglykane sind hier mittels ihres "Core" - Protein-Teiles an ein Rückgrat von Hyaluronsäure angeheftet. Diese Bindung ist nicht kovalent geknüpft, sondern wird durch das "Link" - Protein stabilisiert. Jedes "Core" - Proteinmolekül kann bis zu 100 Seitenketten von Chondroitinsulfat und etwa 30 bis 60 Seitenketten von Keratansulfat besitzen. Das Gesamtmolekulargewicht des Aggregates erreicht 8 - 9 Millionen - abhängig von der Länge der Hyaluronsäurekette und von der Zahl der angehefteten "Core" - Protein- und Glykosaminoglykanmoleküle. Die beträchtliche Raumerfüllung der stark hydratisierten Hyaluronsäure trägt entscheidend zu den mechanischen Eigenschaften der extrazellulären Knorpelmatrix bei.

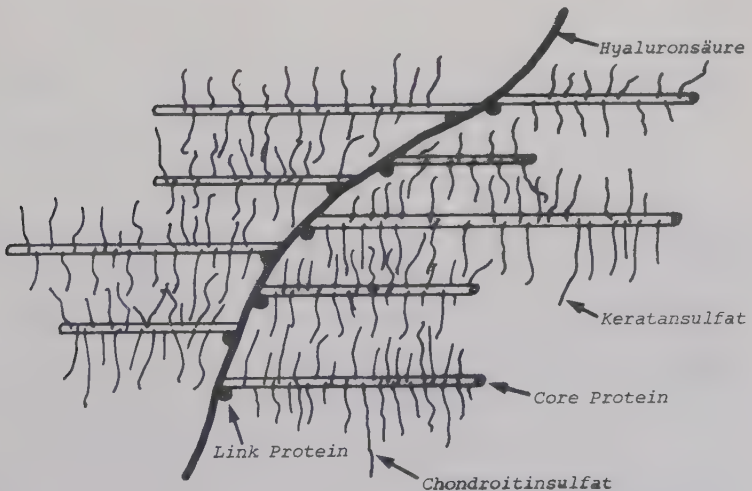


Abb.2: Struktur des Proteoglykan-Aggregates der Knorpelmatrix.

(nach Hascall und Heinegard, in: Slavkin und Greulich, 1975)

Fibronektin ist ein adhäsives Glykoprotein, das als wesentlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix vieler Gewebe identifiziert wurde (Chen et al., 1978; Hedman et al., 1979; zur Übersicht, siehe Yamada und Olden, 1978). Das dimere, disulfid - verknüpfte Molekül besitzt ein Molekulargewicht von 440 000 (vergl. Abb. 3). Blutplasma enthält eine lösliche, dem zellgebundenen Fibronektin sehr ähnliche Komponente, das CIG ("Cold Insoluble Globulin"; zur Übersicht, siehe Chen et al., 1977). Es ist noch ungeklärt, ob diese Plasmaform durch proteolytischen Abbau aus zellgebundenem Fibronektin hervorgeht.

Kollagen, besonders in denaturiertem Zustand, besitzt eine starke Affinität zu Fibronektin (Klebe, 1974; Kleinman et al., 1976; Jilek und Hörmann, 1978; Dessau et al., 1978a).

Biologisch aktive Fibronektin - Fragmente können isoliert werden, in denen die Bindungsfähigkeit zu Kollagen erhalten bleibt (Hahn und Yamada, 1979; Ruoslahti et al., 1979; Gold et al., 1979). Fibronektin interagiert ebenfalls mit sulfatierten Proteoglykanen (Jilek und Hörmann, 1979); derivatisiert mit bifunktionellen Reagenzien, vernetzt es sich an der Zelloberfläche zu einem Fibronektin - Proteoglykan - Komplex (Perkins et al., 1979).

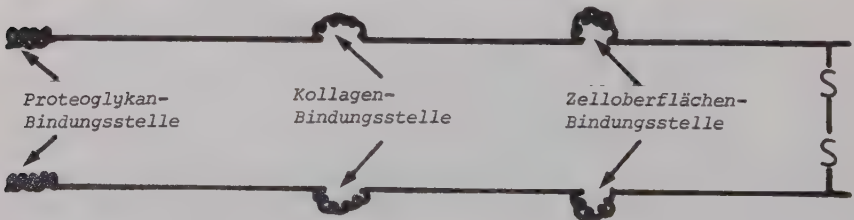


Abb. 3: Schematische Struktur des Fibronektinmoleküls.

Die genannten Eigenschaften des Fibronektins, d.h. seine Fähigkeit, an die Zelloberfläche, an Kollagen und an Glykosaminoglykane zu binden, weisen ihm eine Schlüsselrolle in der Organisation der extrazellulären Matrix zu.

Neben der "statischen" Funktion der extrazellulären Matrix - Form und Funktion der Gewebe im Organismus zu gewährleisten - besitzt sie in embryonalen Entwicklungsprozessen die Rolle eines permissiven Faktors. Kollagensubstrate fördern die Knorpeldifferenzierung von embryonalen Hühnersomiten und Gliedmaßenanlagen (Kosher und Church, 1975; von der Mark, 1978). Gleichfalls vermindern sie den Abbau von Glykosaminoglykanen in Epithelzellkulturen und ermöglichen die Ausbildung einer Basalmembran (David und Bernfield, 1979).

Die Komponenten der ECM bilden ferner das Substrat für das Anhaften und die Wanderung von Mesenchym- und Epithelzellen. Während der Embryonalentwicklung des Vertebratenembryos wandern Neuralleistenzellen auf präzisen Routen relativ weite Strecken, bevor sie sich in so unterschiedliche Zelltypen wie Schwann Zellen, Pigment- und Mesenchymzellen differenzieren. Eine mögliche Erklärung für das exakte Einhalten dieser Routen wäre, daß die Komponenten der ECM, die das Substrat für die Zelladhäsion bilden, aufgrund von Anordnung und Ausrichtung des fibrillären Materials die Wanderungsrichtung der migrierenden Zellen bestimmen.

Kollagen kommt ferner während der Myogenese die Rolle eines permissiven Faktors zu: Erst die Einführung von Kollagen-beschichteten Gewebekulturschalen durch Hauschka und Konigsberg (1966) ermöglichte es, die Differenzierung von einkernigen Muskelzellen zu vielkernigen Muskelschläuchen in normalen Kulturmedien in vitro zu studieren. Heute wissen wir, daß das Kollagensubstrat unter Zellkulturbedingungen die Plasmaform des Fibronektins aus dem Kulturmedium aufnimmt. Erst dieses "Sandwich" aus Kollagen/Fibronektin vermittelt das Anhaften und die Differenzierung von Muskelzellen (Chiquet et al., 1979; eigene Untersuchungen).

Als letztes Beispiel für den Einfluß der ECM auf Differenzierungsprozesse sei die Entwicklung der knorpeligen Wirbelkörperanlagen genannt. Zwischen dem ersten und vierten Tag der Embryonalentwicklung des Huhnes synthetisieren die Axialorgane Neuralrohr und Chorda ein faseriges, extrazelluläres Material. Auf diese Matrix wandern Sklerotomzellen der Somiten ab dem vierten Tag zu und differenzieren sich zu Chondrozyten, charakterisiert durch die Synthese des knorpelspezifischen Typ II Kollagens und des Chondroitinsulfat-Proteoglykans (Minor, 1973; Strudel, 1975; Kosher et al., 1973).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß zahlreiche Beispiele die Bedeutung der ECM in der Embryonalentwicklung unterstreichen. In keinem Fall ist jedoch bekannt, welcher Mechanismus ihrem Einwirken auf Differenzierungs- und Gestaltsbildungsprozesse zugrunde liegt. Dies ist darin begründet, daß direkte Aussagen über die Funktion von Molekülen nur in biologischen Systemen erhalten werden können, in denen Mutanten verfügbar sind. Hier läßt sich der Ablauf des normalen Vorganges mit dem gestörten Prozess vergleichen, bei dem ein partieller oder vollständiger Ausfall einer Komponente vorliegt. Da im Hühnersystem keine ausreichende Auswahl an Mutanten verfügbar ist, muß nach anderen Möglichkeiten gesucht werden, die Ausbildung der extrazellulären Matrix zu "stören". Diese Einwirkung sollte im Idealfall reversibel sein, um zu zeigen, daß die Zellen nicht geschädigt werden, und ihr Entwicklungspotential erhalten bleibt.

Um die Rolle der extrazellulären Matrix in Differenzierungsprozessen verstehen zu lernen, ist es notwendig, ihre Strukturveränderungen zu untersuchen. Geeignete Zellkultursysteme sollten hierfür zwei Anforderungen genügen: Bisherige Untersuchungen sollten eine Einflußnahme der ECM auf den Entwicklungsablauf vermuten lassen; das Differenzierungsprogramm sollte sich durch äußere Einwirkung reversibel beeinflussen lassen.

Aufgrund dieser Kriterien wurden für die vorliegende Arbeit drei Zellkultursysteme als Modelle ausgewählt:

1. Embryonale Mesenchymzellen, die zu Knorpel differenzieren.
2. Differenzierte Knorpelzellen, die ihre Knorpelmatrix rekonstituieren.
3. Einkernige Muskelzellen, die zu Muskelschläuchen differenzieren.

Die Entscheidung zur Untersuchung mehrerer Differenzierungsmodelle wurde getroffen, um dem Risiko zu begegnen, das in dem Studium von nur einem - möglicherweise atypischen - Kultursystem liegt.

Embryonale Mesenchymzellen vermögen in vitro zu Knorpel zu differenzieren. Es ist noch unbekannt, wie der Vorgang der Chondrogenese initiiert und gesteuert wird. Eine plausible Hypothese geht von der Vorstellung aus, daß die Komponenten der extrazellulären Matrix die Knorpeldifferenzierung lenken. In diese Richtung weisen Untersuchungen, nach denen Proteoglykane bzw. Kollagen die Chondrogenese fördern (Kosher et al., 1973; Kosher und Church, 1975; von der Mark, 1978). Hohe Zelldichte, d.h. ein hohes Maß an Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktionen ist hierbei der wichtigste Faktor für den Ablauf der Knorpeldifferenzierung in vitro (Caplan, 1970). Die Chondrogenese selbst ist von einer Änderung der Genexpression begleitet: Embryonale Mesenchymzellen synthetisieren Typ I Kollagen, Chondrozyten dagegen das knorpelspezifische Typ II Kollagen (Linsenmayer et al., 1973; von der Mark und von der Mark, 1977).

Chondrozyten (Knorpelzellen) halten ihren Phänotyp - d.h. die Synthese der zellspezifischen Proteine Typ II Kollagen und Chondroitinsulfat-Proteoglykan - in vitro unter optimalen Kulturbedingungen für eine gewisse Zeit aufrecht. Auch hier sind Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktionen ausschlaggebende Faktoren (Lavietes, 1970). Unter ungünstigeren Kulturbedingungen bzw. in älteren Kulturen beobachtet man eine Alterung ("Dedifferenzierung") der Chondrozyten, die mit einer Abschaltung der Synthese der knorpelspezifischen Proteine verbunden ist (Holtzer und Abbott, 1968; Schiltz et al., 1973; Müller et al., 1975; Mayne et al., 1975; von der Mark et al., 1977; Müller

et al., 1977). Natürliche Bestandteile der Knorpelmatrix, z. Bsp. exogene Proteoglykane, stabilisieren hierbei den Knorpelphänotyp (Nevo und Dorfman, 1972; Huang, 1974). Fibronektin hingegen - kein Bestandteil der Matrix von differenzierten Knorpelzellen - bewirkt eine rasche Dedifferenzierung der Chondrozyten (West et al., 1979).

Myoblasten (einkernige Muskelzellen) differenzieren in vitro zu Muskelschläuchen. Hierfür benötigen sie Kollagen- bzw. Fibronektin- beschichtete Gewebekulturschalen (Hauschka und Königsberg, 1966; Chiquet et al., 1979). Die Funktion der Matrixproteine liegt in diesem Kultursystem vermutlich vorwiegend in der Vermittlung der Zelladhäsion.

Zwei Einwirkungsmöglichkeiten sind bekannt, die oben aufgeführten Zellkultursysteme reversibel zu beeinflussen. Zum einen lassen sich temperaturempfindliche Mutanten von RNA-Tumroviren dazu benützen, Zellen temperaturabhängig zu transformieren (Wyke, 1973). Eine zweite Möglichkeit bieten bestimmte Kokarzinogene, die reversibel Differenzierungsprozesse zu hemmen vermögen (Diamond et al., 1978). Obwohl diese Einwirkungen das gesamte Syntheseprogramm von Zellen beeinflussen, sind die Komponenten der extrazellulären Matrix besonders stark betroffen. Charakteristische Veränderungen des Kollagens (Arbogast et al., 1977; Delclos und Blumberg, 1979), des Fibronektins (Olden und Yamada, 1977; Vaheri und Ruoslahti, 1975; Blumberg et al., 1976) und der Proteoglykane (Pacifci et al., 1977; Pacifci und Holtzer, 1977) wurden beschrieben. Diese Beobachtungen legen es nahe, auf die ausgewählten Zellkultursysteme der Knorpel- und Muskeldifferenzierung mittels Virustransformation bzw. Kokarzinogenen einzuwirken.

AUFGABENSTELLUNG

Diese Arbeit sollte im Rahmen des Themas "Bindegewebisdifferenzierung" Veränderungen im Synthese- und Ablagerungsmuster des Kollagen- und Fibronektinanteils der extrazellulären Matrix (ECM) während der Knorpel-

und Muskeldifferenzierung untersuchen und einen Zusammenhang zwischen dem Zelldifferenzierungszustand und der Struktur der ECM aufzeigen. Da Virustransformation bzw. das Kokarzinogen PMA diese Entwicklungsvorgänge reversibel blockierten, sollte diese "Störung" der Knorpel- und Muskel-differenzierung dazu dienen, anhand des Vergleiches der Zusammensetzung und Struktur der ECM während der normalen und der gestörten Entwicklung weitere Informationen über die Interaktion zwischen Zelle und Matrix zu erhalten.

Für diese Fragestellung boten sich drei Zellkultursysteme besonders an:

- 1) Embryonale Mesenchymzellen, die zu Knorpel differenzieren.
- 2) Differenzierte Knorpelzellen, die ihre Knorpelmatrix rekonstituieren.
- 3) Einkernige Muskelzellen, die zu Muskelschläuchen differenzieren.

In diesen Entwicklungsmodellen sollten Veränderungen in der Zusammensetzung und der Struktur der extrazellulären Matrix durch biochemische und immun-histologische Methoden untersucht werden. Dies geschah auf folgende Weise: Durch metabolische Markierung wurden die Syntheseraten der einzelnen Kollagentypen bestimmt; neu synthetisiertes Fibronektin wurde durch Immunpräzipitation nachgewiesen. Da in Knorpel- und Muskelzellkulturen während der Differenzierung Zellen unterschiedlichster Entwicklungsstadien nebeneinander auftraten, biochemische Methoden jedoch über alle Zellen einer Gewebekulturschale "mitteln", wurde die indirekte Immunfluoreszenz-technik als Ergänzung herangezogen. Mittels spezifischer Antikörper gelang es auf diese Weise, die Verteilung der Matrixproteine auf der Ebene der einzelnen Zelle zu bestimmen und ihr Ablagerungsmuster im extrazellulären Raum festzustellen.

Die erhaltenen Befunde sollten einen näheren Einblick in die Wechsel-beziehung zwischen Zelle und Matrix geben. Es wurde erhofft, so bessere Voraussetzungen für die Erreichung eines Fernzieles zu schaffen: den Mechanismus, mit dem die extrazelluläre Matrix Differenzierungsvorgänge beeinflusst, auf molekularer Ebene zu verstehen.

A) DAS EXTRAZELLULÄRE PROTEINMUSTER VON KNORPELZELLEN

1. Veränderungen des extrazellulären Proteinmusters während der Knorpeldifferenzierung.

Einführung

Mesenchymgewebe der Vertebratengliedmaßenanlage differenziert in vivo hauptsächlich in drei Gewebetypen: Knorpel, Muskel und Bindegewebe (Abb. 4). Bis zum Entwicklungsstadium 22 sind die Mesenchymzellen

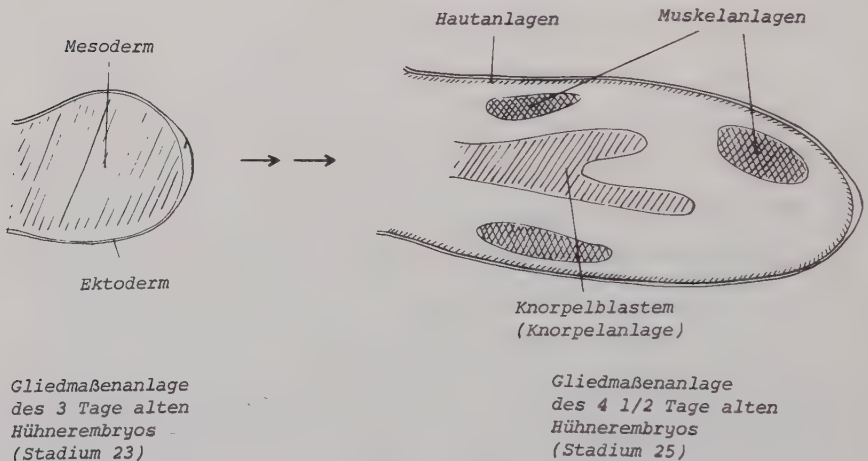


Abb. 4: Differenzierungsverlauf der Gliedmaßenanlage des Hühnerembryos.

locker gepackt und durch ausgedehnte, bis zu 4μ lange Zell-Zellkontakte miteinander verbunden (zur Übersicht, siehe Searls, 1973). Mit der Entwicklung der knorpelbildenden Region im Zentrum der Gliedmaßenanlage steigt die Zelldichte, während das Ausmaß der Zell-Zellkontakte abnimmt. Am Ende des Stadiums 24 sind die Zellen in der prospektiven Knorpelregion um 10% bis 30% dichter gepackt als in anderen Teilen der Gliedmaßenanlage (Searls, 1973); interzelluläre Prozesse sind auf eine Länge von weniger als 1μ geschrumpft, während sich der Raum zwischen Zellen und die Deponierung extrazellulären Materials erhöht haben.

Klassisch wurde der Beginn der Knorpeldifferenzierung durch das Erscheinen metachromatisch anfärbbarer extrazellulärer Matrix und durch den Einbau von ³⁵S-Sulfat in Glykosaminoglykane festgestellt. Die Entdeckung zweier knorpelspezifischer Marker, Typ II Kollagen (Miller und Matukas, 1969) und Chondroitinsulfat-Proteoglykan (Hascall und Heinegard, 1974; Okayama et al., 1976; Ho et al., 1977) ermöglichte die einwandfreie Identifizierung von Knorpelzellen (zur Übersicht, siehe von der Mark und Conrad, 1979). Biochemisch konnte die Synthese von Typ II Kollagen ab dem Stadium 25/26 nachgewiesen werden (Linsenmayer et al., 1973). Mithilfe der empfindlicheren Immunfluoreszenztechnik wurden Spuren von Typ II Kollagen bereits im späten Stadium 24 im Zentrum der Gliedmaßenanlage aufgefunden (von der Mark et al., 1976; Dessau et al., 1980).

Die Expression von Typ I Kollagen verläuft entgegengesetzt zu der von Typ II Kollagen. Typ I Kollagen wurde in frühen Stadien der Gliedmaßenentwicklung angetroffen, nicht jedoch mehr im differenzierten Knorpel (Linsenmayer et al., 1973; von der Mark et al., 1976a). Eine entsprechende Verteilung weist Fibronectin auf: Es wurde in undifferenziertem Mesenchym, nicht aber im erwachsenen Knorpel nachgewiesen (Linder et al., 1975; Wartiovaara et al., 1979; Dessau et al., 1980).

Die Differenzierung des Gliedmaßenmesenchyms läßt sich auch in Zellkultur studieren. Entsprechend den prospektiven Geweben Haut, Muskel und Knorpel, entwickeln sich die embryonalen Mesenchymzellen in vitro zu Fibroblasten, Myoblasten und Chondrozyten. Niedrige Zelldichte begünstigt dabei die Ausbildung von Fibroblasten und Myoblasten; dichte Kulturen differenzieren dagegen bevorzugt zu Knorpel (Abb. 5).

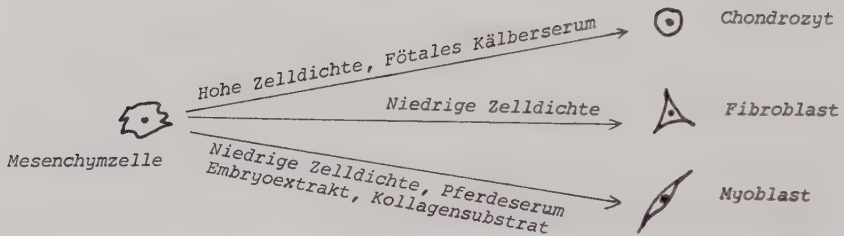


Abb. 5: Schematische Darstellung der Differenzierung embryonaler Mesenchymzellen in vitro.

Werden die Mesenchymzellen in Kultur zuerst für 2 - 8 Tage in mittleren Zelldichten gehalten, dann trypsinisiert und in hoher Zelldichte ausplattiert, tritt keine Knorpeldifferenzierung mehr ein. Die Zellen haben offensichtlich einen anderen Differenzierungsweg eingeschlagen und dabei die Fähigkeit zur Chondrogenese verloren. Auch Substanzen wie Bromdesoxyuridin (Levitt und Dorfman, 1972, 1973) und Vitamin A (Lewis et al., 1978) blockieren die Knorpeldifferenzierung irreversibel.

Aufgrund dieser Ergebnisse stellte sich die prinzipielle Frage nach der Möglichkeit, die Chondrogenese der Mesenchymzellen zu unterbinden, ohne dabei ihr Differenzierungspotential zu zerstören. Bei der Suche nach Substanzen, die eine reversible Hemmung der Differenzierung bewirken könnten, boten sich Kokarzinogene aus der Gruppe der Phorbol-ester als aussichtsreichste Kandidaten an. Kokarzinogene sind Verbindungen, die - im Tiermodell nach dem eigentlichen Karzinogen appliziert - dessen Tumor-auslösende Wirkung bis zum 1000fachen steigern können; allein angewandt, sind sie jedoch nicht krebserregend (zur Übersicht, siehe Hecker, 1975). Das stärkste bekannte Kokarzinogen ist der Phorbol-ester PMA (Phorbol-12-myristat-13-azetat), isoliert aus dem aus Pflanzensamen gewonnenen Krotonöl (Abb. 6).

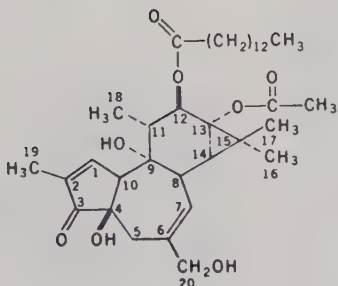


Abb. 6: Struktur des Kokarzinogens
PMA (Phorbol-12-myristat-
13acetat).

Es sind eine Reihe von Beispielen bekannt, in denen Phorbolester in Differenzierungsvorgänge eingreifen. So unterdrückt PMA die Synthese von Hämoglobin in Erythroleukämiezellen (Rovera et al., 1977; Yamasaki et al., 1977) und die von Chondroitinsulfat-Proteoglykan in Knorpelzellen (Lowe et al., 1978). Weiterhin verhindert PMA die Differenzierung von Myoblasten (Cohen et al., 1977) und von Melanozyten (Payette et al., 1980).

Diese Untersuchungen legten es nahe, den Einfluß von PMA auf die Chondrogenese embryonaler Mesenchymzellen zu prüfen. Strukturänderungen der extrazellulären Matrix während des "gestörten" Entwicklungsprozesses sollten dann denen des normalen Differenzierungsverlaufes gegenübergestellt werden. Als Untersuchungssystem wurde die Massenkultur von Mesenchymzellen in hoher Dichte gewählt (Caplan, 1970). Die Chondrogenese ließ sich hier anhand der Synthese des knorpelspezifischen Typ II Kollagens (von der Mark und von der Mark, 1977) leicht verfolgen. Die Lokalisierung der Strukturkomponenten der ECM erfolgte dann mittels der indirekten Immunfluoreszenztechnik.

1. Die Knorpeldifferenzierung von Mesenchymzellen.

Morphologische Beobachtungen - Charakterisierung des Zellkultursystems

Hohe Zelldichte ist der wichtigste Faktor für die Chondrogenese embryonaler Mesenchymzellen *in vitro* (Caplan, 1970). Zur Erzielung von hohen, reproduzierbaren Knorpeldifferenzierungsraten wurden daher für alle Experimente über-konfluente Kulturen angesetzt. Um die Zahl der hierfür benötigten Mesenchymzellen niedrig zu halten, erwies es sich als günstig, die Zellsuspension nicht über die gesamte Fläche der Gewebekulturschale auszusähen, sondern sie im Zentrum in einem 50 μ l Tropfen zu inokulieren (Ahrens et al., 1978). Mit dieser Technik konnten nach Präparation der Gliedmaßenanlagen von 30 Hühner-embryonen bis zu 60 "Mikromassenkulturen" angesetzt werden.

Nach Isolierung der Anlagen (Abb. 7) wurde eine Einzelzellsuspension durch Trypsinbehandlung erhalten. Ausplattiert in einem Mikrotropfen, war die Mehrzahl der Zellen bereits nach einer Stunde angehaftet (Abb. 8a). Während der ersten 12 h in Kultur blieb die Verteilung der Zellen gleichförmig. Nach 24 - 30 h bildeten sich wirbelförmige Bereiche in der Zellschicht (Abb. 8b). Innerhalb dieser Aggregate formierten sich später die ersten, differenzierten Chondrozyten, im Phasenkontrastmikroskop erkennbar als abgerundete, durchscheinende Zellen (Abb. 8c).

Nach mehreren Tagen bildeten Hunderte von ineinanderfließenden Chondrozyten-Aggregaten ein einheitliches Knorpelplateau aus; umrahmt war diese Zellmasse von einem Ring konfluenter Mesenchymzellen (Abb. 8d). Am Rande der Kultur befand sich die Auswuchszone mit relativ niedriger Zelldichte - die Morphologie der Mesenchymzellen in diesem Bereich (Abb. 8e) erinnerte an die "dedifferenzierter" Chondrozyten oder gealterter Fibroblasten. Nach 12-14 Tagen in Kultur färbten sich die älteren Knorpelregionen infolge von Calcifizierung dunkel (Abb. 8f; vergl. Osdoby und Caplan, 1979).

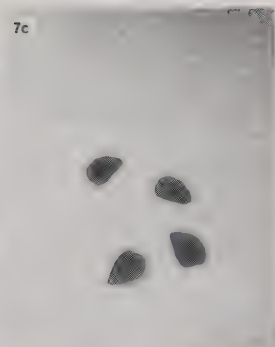
7a



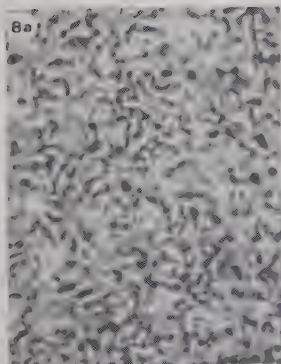
7b



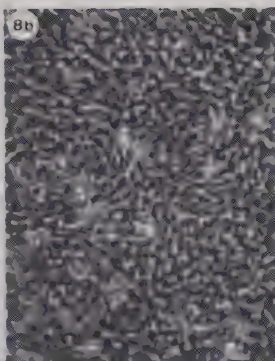
7c



8a



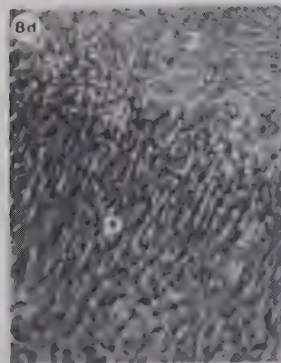
8b



8c



8d



8e



8f

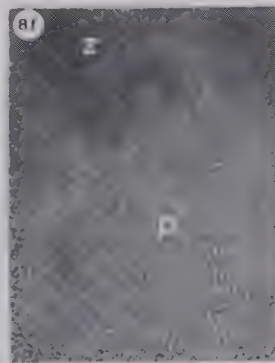


Abb. 7: Präparation der Gliedmaßenanlagen.

Vergr. ca. 3 x.

- a) Der Hühnerembryo (Entwicklungsstadium 23) wird vom Dottersack befreit.
- b) Der Kopf wird abgetrennt.
- c) Die Gliedmaßenanlagen werden abgeschnitten.

Abb. 8: Gliedmaßenmesenchymzellen in Mikromassenkultur.

Vergr. a-d: 140 x, e: 360 x, f: 60 x; Phasenkontrastaufnahme.

- a) 1 h in Kultur.

Die Zellen haben sich angehaftet; etwa die Hälfte hat sich bereits ausgebreitet.

- b) 30 h in Kultur.

Ein dichter, über-konfluenten Zellrasen ist entstanden. Wirbelförmige Muster sind jetzt zu erkennen - die Vorstufe für die Anhäufung der Zellen zu vielschichtigen Zellaggregaten.

- c) 60 h in Kultur.

Die Zellen innerhalb des Aggregates haben sich zu Chondrozyten differenziert (im Phasenkontrastmikroskop als durchscheinende, abgerundete Zellen identifizierbar).

- d) 120 h in Kultur.

Eine dicke Zellschicht von Knorpelzellen bildet das Zentrum (z) der Kultur. Sie ist an der Peripherie (p) umgeben von einem Monolayer undifferenzierter Mesenchymzellen.

- e) 120 h in Kultur.

In der Auswuchszone am Rande der Mikromassenkultur nehmen die Mesenchymzellen fibroblastenartige Morphologie an.

- f) 384 h in Kultur.

Lange Kulturdauer bewirkt Calcifizierung. Sie zeigt sich in der Dunkelfärbung der älteren Knorpelknoten im Zentrum (z) der Kultur. Jüngere Knorpelknoten, die sich erst später an der Peripherie (p) gebildet haben, sind noch durchscheinend.

Untersuchung der Kollagensynthese

Die morphologische Charakterisierung des Mesenchymzellkultursystems hatte ergeben, daß die Mehrzahl der Zellen - mit Ausnahme der peripheren Bereiche der Kultur - zu Chondrozyten differenzierte. Diese Beobachtung sollte nun durch den Nachweis des knorpelspezifischen Typ II Kollagens bestätigt werden. Hierzu wurde der Anteil der einzelnen Kollagentypen in den ^3H -Prolin markierten Proben nach Pepsinabbau durch SDS-Disk-elektrophorese bestimmt. Diese Methode ergibt für Hühnerkollagentypen ein Trennmuster, wie es in Abb. 9 dargestellt ist.



Abb. 9: Schematisches Bandenmuster der Hühnerkollagentypen nach Trennung durch SDS-Diskelektrophorese. Ketten, die sich im Gemisch nicht voneinander abtrennen, sind eingeraht ($\alpha 1(I); \alpha 1(II)$).

Die $\alpha 1(I)$ -, die $\alpha 1(II)$ - und die αA -Ketten konnten im Gemisch nicht immer voneinander getrennt werden. Der Anteil der Synthese des Typ I bzw. Typ V Kollagens ließ sich jedoch anhand der $\alpha 2(I)$ - bzw. αB -Ketten ermitteln. Die Synthese von Typ II Kollagen konnte dann aufgrund des $\alpha 1/\alpha 2$ Verhältnisses errechnet werden. Ein $\alpha 1/\alpha 2$ Quotient von 2,12 zu 1 - gemessen in Kulturen undifferenzierter Mesenchymzellen - diente hierbei als Bezugspunkt (= 0% Typ II Kollagen).

Während der ersten 48 h fand sich in den Kulturen der Mesenchymzellen neben einem geringen Anteil von Typ V Kollagen nur Typ I Kollagen. Am dritten Tag wurde bereits etwas Typ II Kollagen synthetisiert - sein Anteil stieg bis zum fünften Tag auf 85% an (Abb. 10, 11). Die maximal erreichte Typ II Kollagensynthese lag in fünf Experimenten zwischen 73% und 89% des Gesamtkollagens - eine Bestätigung der morphologischen Beobachtungen.

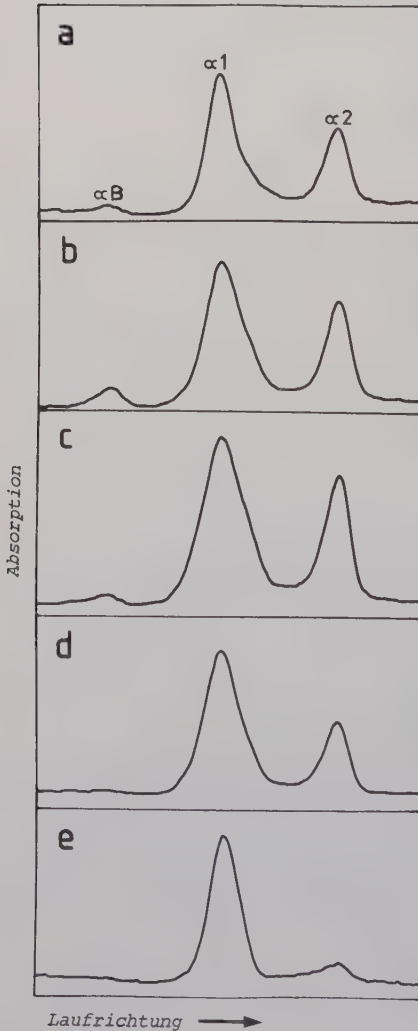


Abb. 10: Änderung der Kollagensynthese während der Knorpel-differenzierung von Mesenchymzellen.

Die Mikromassenkulturen wurden für 24 h mit ^3H -Prolin markiert, Medium und Zellschicht vereinigt und mit Pepsin gespalten. Nach Auftrennung durch SDS-Diskelektrophorese auf einem 6% Gel wurden die Banden durch Fluorographie lokalisiert. Die densitometrische Auswertung zeigt den Bereich der Kollagen α -Ketten.

a - e) Markierungszeitraum
(Stunden in Kultur)

- a) 1 - 24 h
- b) 24 - 48 h
- c) 48 - 72 h
- d) 72 - 96 h
- e) 96 - 120 h

Die Nachweisgrenze für 1(III)-Kollagenketten beträgt etwa 5% - 10% - bezogen auf die Gesamtkollagensynthese. Geringere Anteile bleiben im Untergrund zwischen den $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ Peaks verborgen.

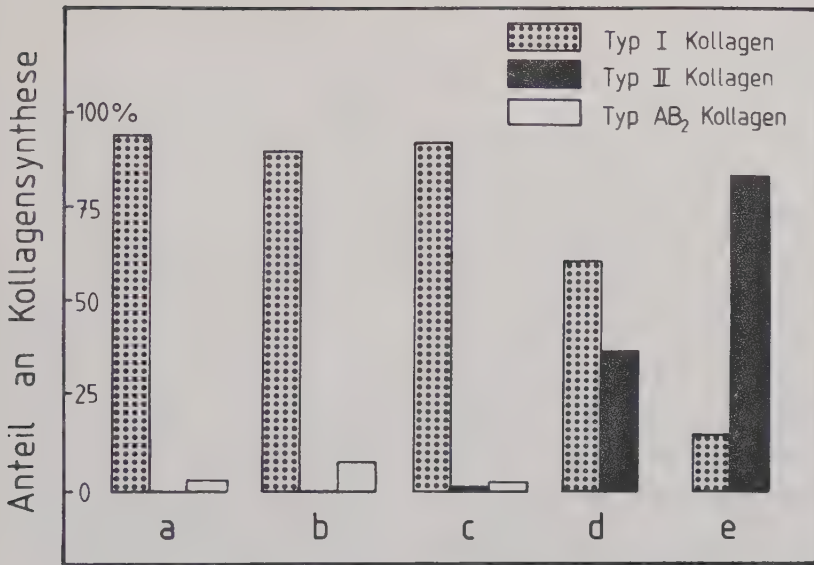


Abb. 11: Änderung der Kollagensynthese während der Knorpeldifferenzierung:

Schematische Darstellung der relativen Anteile der Kollagentypen

I, II und V (= AB₂). Markierungszeitraum (Stunden in Kultur):

a) 1-24 h; b) 24-48 h; c) 48-72 h; d) 72-96 h; e) 96-120 h.

Die Werte wurden durch planimetrische Auswertung der Abb. 10 erhalten und repräsentieren die Daten eines typischen Versuches.

In fünf unabhängigen Experimenten betrug die maximale Typ II Kollagen Syntheserate 81%, 73%, 85%, 83% und 89%. Die folgenden Formeln berücksichtigen die Kettenzusammensetzung von Typ I:

($\alpha_1(I)_2\alpha_2$) und Typ V: (AB₂) Kollagen, sowie die Tatsache, daß $\alpha_1(I)$, $\alpha_1(II)$ und αA gemeinsam im α_1 -Peak gemessen werden.

Nach Abzug des Typ V Kollagen-Anteils betrug das α_1/α_2 -Verhältnis in fünf Experimenten von Kulturen undifferenzierter Mesenchymzellen 2,07; 2,15; 2,20; 2,06 und 2,13 (Mittelwert: 2,12; theoretisch für 100% Typ I Kollagen zu erwartender Wert: 2,00).

Der sich rein rechnerisch ergebende Wert von 3,8% Typ II Kollagensynthese ist auf einen Überschuß von $\alpha_1(I)$ - Ketten zurückzuführen und wurde im Diagramm Typ I Kollagen zugerechnet.

$$\% \text{ Typ II} = \frac{\alpha_1 - 2\alpha_2 - 0,5\alpha_B}{\alpha_1 + \alpha_2 + \alpha_B} \times 100$$

$$\% \text{ Typ V (AB}_2\text{)} = \frac{1,5 \alpha_B}{\alpha_1 + \alpha_2 + \alpha_B} \times 100$$

$$\% \text{ Typ I} = \text{Differenz zu 100\%}$$

Biochemische Untersuchung der extrazellulären Proteine

Zum Studium der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix von Mesenchymzellkulturen wurde die Laktoperoxidase - katalysierte Jodierung eingesetzt. Diese Methode basiert auf der Fähigkeit des Enzyms, radioaktives Jod auf Tyrosinreste von Proteinen zu übertragen. Führt man diese Reaktion mit lebenden Zellen durch (Hubbard und Cohn, 1972), so bleibt sie auf tyrosinhaltige, der Laktoperoxidase zugängliche, extrazelluläre Proteine beschränkt, da das Enzym nicht in das Zellinnere eindringen kann. Nach erfolgter Jodierung werden die Zellen in SDS-haltigem Puffer gelöst, und die Proteine in der SDS-Diskelektrophorese aufgetrennt. Im Muster der Gesamtzellproteine können die extrazellulären Komponenten - nur sie sind radioaktiv markiert - durch Autoradiographie nachgewiesen werden.

Mithilfe dieser Methode wurde in Mesenchymzellkulturen unterschiedlichster Entwicklungsstadien ein vorherrschendes extrazelluläres Protein aufgefunden (Abb. 12a-d; markiert mit "1"). Es zeigte in der SDS-Diskelektrophorese im Polyacrylamid-Gradientengel die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie authentisches Fibronectin von Chondrozyten (Abb. 12e) oder Fibroblasten (nicht gezeigt).

Mit fortschreitender Knorpeldifferenzierung wurde ein zweites extrazelluläres Protein exprimiert (Abb. 12; markiert mit "2"). Dieses besaß in der SDS-Diskelektrophorese ein "scheinbares" Molekulargewicht von 180 000.

Ein beträchtlicher Anteil Jod-markierten Materials vermochte nicht in das 3% Sammelgel einzudringen (Abb. 12, markiert mit "▼"). Es handelte sich hierbei vermutlich um ein Gemisch hochmolekularer Proteoglykane und kovalent vernetzter Aggregate von Matrix- und

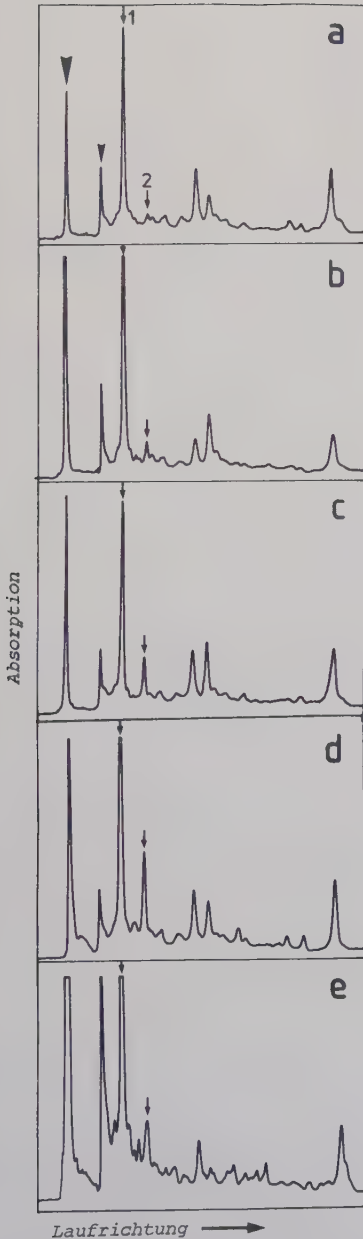


Abb. 12: Änderung des Musters der extrazellulären Proteine während der Knorpeldifferenzierung von Mesenchymzellen.

Nach der Laktoperoxidase-katalysierten Markierung der extrazellulären Proteine mit ^{131}J wurde die Zellschicht in SDS-Probenpuffer gelöst, und die Proteine durch SDS-Diskelektrophorese in einem 6 - 18% linearen Gradienten von Acrylamid aufgetrennt. Nach autoradiographischer Lokalisierung wurden die Bandenmuster densitometrisch ausgewertet.

Der große Pfeil (▼) bezeichnet die Oberfläche des Sammelgels, der kleine (▼) die Grenzfläche zwischen Sammel- und Trenngel. "1" markiert die Position von Fibronectin, "2" die des Proteins mit dem "scheinbaren" Molekulargewicht von 180 000.

a - d) Mikromassenkulturen von Mesenchymzellen.

- a) 24 h in Kultur.
- b) 48 h in Kultur.
- c) 72 h in Kultur.
- d) 120 h in Kultur.
- e) Chondrozyten, isoliert aus dem Sternum embryonaler Hühner; 72 h in Kultur.

Zelloberflächenproteinen. Radioaktives Protein, das an der Grenzfläche zwischen Sammel- und Trenngel lokalisiert wurde (Abb. 12; markiert mit "▼"), stellte einen Artefakt der Diskelektrophorese dar. Die Konzentrierung der Proteinprobe an dieser Grenzfläche führte bei schwer löslichen, zur Aggregation neigenden Proteinen wie Fibronektin, leicht zur Präzipitation. Der Anteil dieses Materials schwankte daher bei Mehrfachausführung der Diskelektrophorese stark und stieg stets dann an, wenn die Beladung des Gels mit Protein erhöht wurde. Kollagen trat im Muster der enzymatisch jodierten Proteine nicht hervor - aufgrund seines niedrigen Tyrosingehaltes wurde es offensichtlich nur schwach markiert.

Zur Prüfung der Frage, ob Mesenchymzellen selbst Fibronektin synthetisierten oder nur passiv aus dem Medium aufnahmen, wurden Kulturen mit ^3H -Glukosamin, das bevorzugt in Glykoproteine eingebaut wird, markiert. Die Einbaustudie zeigte, daß Mesenchymzellen in vitro eine sehr hohe Fibronektin-Syntheserate aufwiesen: Im Muster der zellulären und der ins Kulturmedium abgegebenen Proteine stellte es die vorherrschende Bande (Abb. 13a, 14a; markiert mit "1"). Deren Identität wurde mittels Immunpräzipitation mit anti-Fibronektin-Antikörpern nachgewiesen (Abb. 13b, 14b).

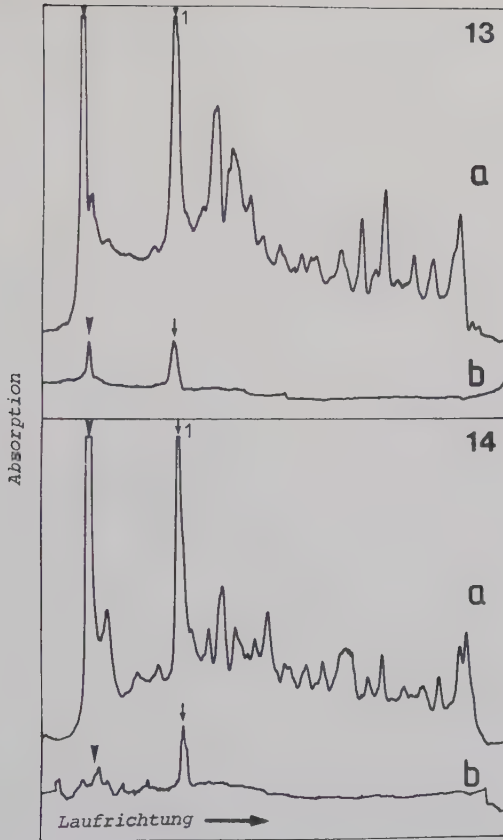


Abb. 13, 14: Nachweis von Fibronektin im Glykoproteinmuster der Zellschicht (13) und des Mediums (14) einer Mikromassenkultur von Mesenchymzellen. Nach 12 h in Kultur wurden die Zellen für 24 h mit ^3H -Glukosamin markiert. Die Proteine wurden dann durch SDS-Diskelektrophorese auf einem 5-18% linearen Gradienten von Acrylamid aufgetrennt. Nach fluorographischer Lokalisierung wurde das Bandenmuster densitometrisch ausgewertet. Der Pfeil (▼) markiert die Grenzfläche zwischen Sammel- und Trenngel. "1" bezeichnet die Position von Fibronektin.

Abb. 13: a) Gesamtprotein der Zellschicht.
b) wie a), gelöst in 1% Triton X-100 bei pH 11.0 und Immunpräzipitiert mit anti-Fibronektin-Antikörpern.

Abb. 14: a) Gesamtprotein des Kulturmediums.
b) wie a), immunpräzipitiert mit anti-Fibronektin-Antikörpern.

Immunfluoreszenzuntersuchungen

Die Lokalisierung der extrazellulären Matrixproteine Kollagen und Fibronektin erfolgte mittels spezifischer Antikörper in der indirekten Immunfluoreszenztechnik. Die Kulturen wurden hierzu mit Methanol bei -20°C fixiert, dann mit der Antikörperlösung und schließlich mit einer Lösung des fluoreszenzmarkierten, zweiten Antikörpers inkubiert.

Im Verlauf der ersten zwei Tage in Kultur deponierten die Mesenchymzellen ein dichtes extrazelluläres Netzwerk von Typ I Kollagen (Abb. 15a), das in der Immunfluoreszenzdoppelmarkierung zum großen Teil gleichverteilt mit dem von Fibronektin (Abb. 15b) gebildeten Netzwerk war. Nach 48 h - zu diesem Zeitpunkt ließen sich im Zellrasen längst Bereiche erhöhter Zelldichte erkennen - färbten die ersten Zellen im Zentrum dieser Aggregate positiv für das knorpelspezifische Typ II Kollagen an (Abb. 16a). Bei fortgesetzter Kulturdauer schritt die Chondrogenese unter Ausdehnung der Knorpelaggregate weiter fort (Abb. 16b,c).

Mit dem Einsetzen der Differenzierung und der Deponierung der Knorpelmatrix wurde das zuvor gebildete Netzwerk aus Typ I Kollagen/Fibronektin wieder abgebaut. Nach 60 bzw. 72 h in Kultur wurde das Netzwerk von Typ I Kollagen in den Aggregaten zunehmend lückenhaft (Abb. 17a,b); nach 120 h konnte es kaum noch nachgewiesen werden (Abb. 17c). In entsprechender Weise reduzierte sich die Anfärbung für Fibronektin (Abb. 18a,b).

Abb. 15-18: Immunfluoreszenz-Färbungen von Mesenchymzellkulturen.

Abb. 15: Doppelfärbung; 48 h in Kultur; Vergr. 560x.

- a) gefärbt mit Meerschweinchen anti-Typ I Kollagen Antikörpern, gefolgt von FITC-konjugiertem anti-Meerschweinchen γ -Globulin.
- b) gefärbt mit Kaninchen anti-Fibronektin Antikörpern, gefolgt von Rhodamin-konjugiertem anti-Kaninchen γ -Globulin.

Abb. 16: gefärbt mit Kaninchen anti-Typ II Kollagen Antikörpern.

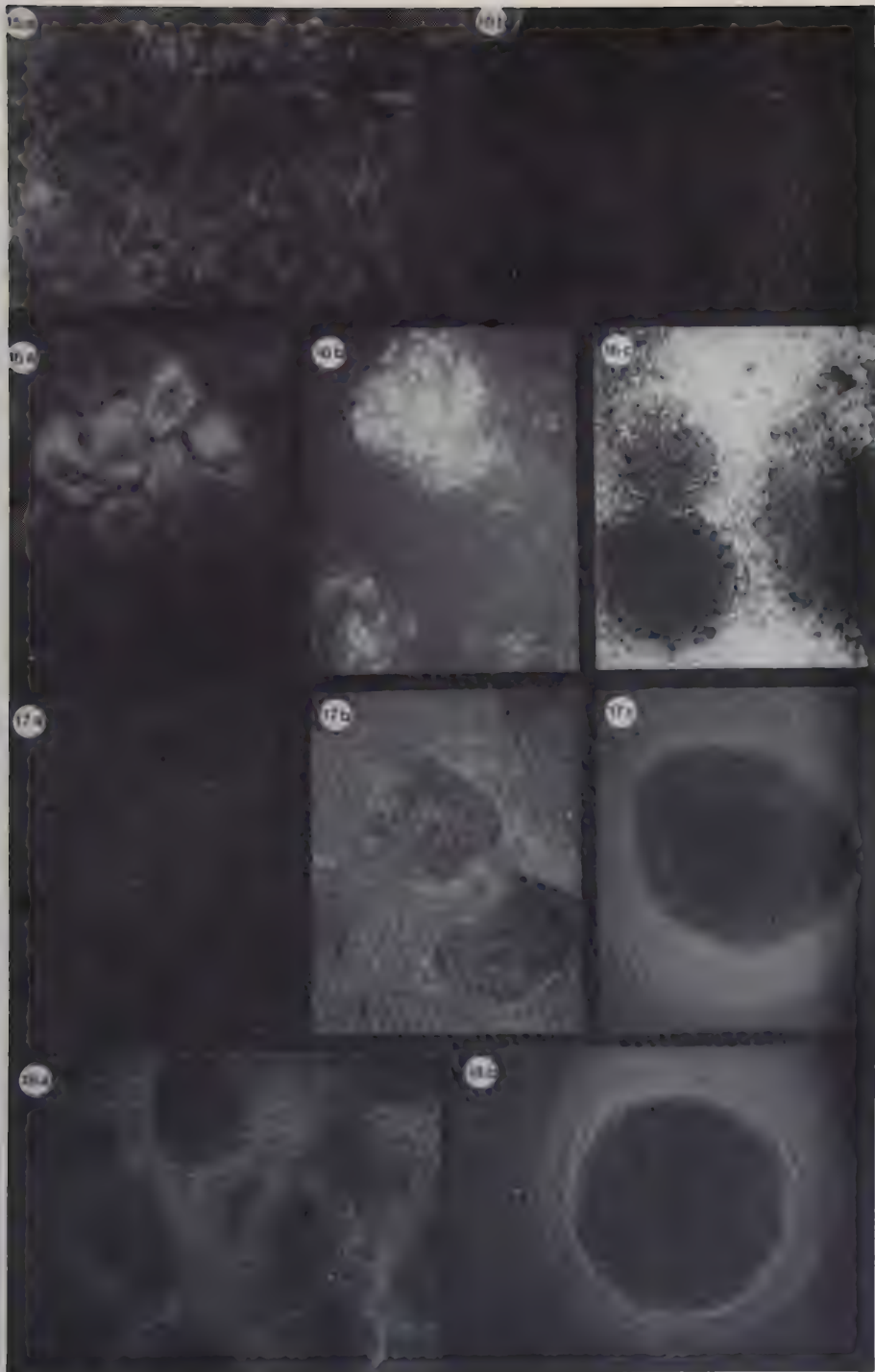
- a) 48 h in Kultur; Vergr. 980x. b) 96 h in Kultur; Vergr. 140x.
- c) 96 h in Kultur; Färbung mit Giemsa-Farbstoff; Vergr. 140x.

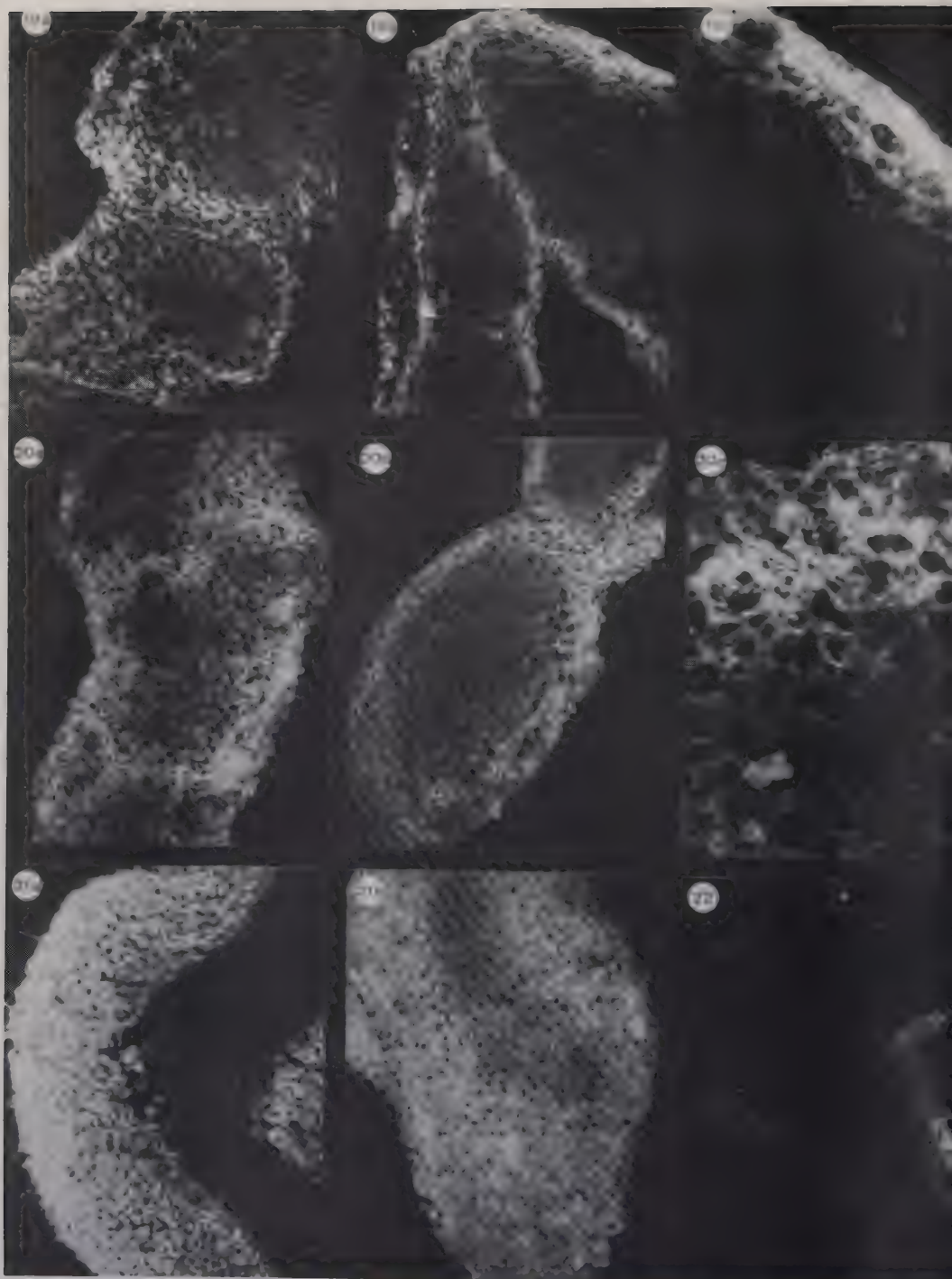
Abb. 17: gefärbt mit Kaninchen anti-Typ I Kollagen Antikörpern.

- a) 60 h in Kultur; Vergr. 140x. b) 72 h in Kultur; Vergr. 140x.
- c) 120 h in Kultur; Vergr. 240x.

Abb. 18: gefärbt mit Kaninchen anti-Fibronektin Antikörpern.

- a) 72 h in Kultur; Vergr. 140x. b) 120 h in Kultur; Vergr. 240x.





Gegen die bisherigen Immunfluoreszenzbefunde könnte ein Einwand erhoben werden: Der massive Knorpelknoten wirke als "Barriere", die das Eindringen des Enzyms Hyaluronidase, das durch Abbau der hochmolekularen Proteoglykane eine demaskierende Wirkung ausübt, und der nachfolgenden Antikörperlösungen verhindere. Es wurden daher Experimente durchgeführt, in denen die Zellschicht mit einem Gummischaber von der Kulturplatte abgehoben und in Compound eingefroren wurde. Nach dem Anfertigen von Gefrierschnitten senkrecht zur Kulturebene lagen dann Zellschicht-Querschnitte vor, die für Enzym- und Antikörperlösungen frei zugänglich waren.

Die Untersuchungen an gefrierageschnittenen Kulturen bestätigten die bisherigen Befunde. Nach Ausbildung eines dichten, die gesamte Dicke der Zellschicht erfassenden Netzwerkes aus Typ I Kollagen/Fibronektin wurde dieses nach Einsetzen der Chondrogenese in zunehmendem Maß wieder abgebaut (Abb. 19a-c; 20a-c). Fibronektin und Typ I Kollagen blieben dabei in dünner Schicht nur an der Oberfläche und am Boden der Zellkultur sowie als perichondriumartige Umrahmung der Knorpelknoten erhalten.

Typ V Kollagen wurde mittels der Immunfluoreszenztechnik sowohl vor (Abb. 21a) als auch nach erfolgter Knorpeldifferenzierung (Abb. 21b) nachgewiesen. Dagegen fand sich Typ III Kollagen nur in Spuren (Abb. 22). Es war unregelmäßig deponiert und vorwiegend im peripheren Bereich der Kultur anzutreffen.

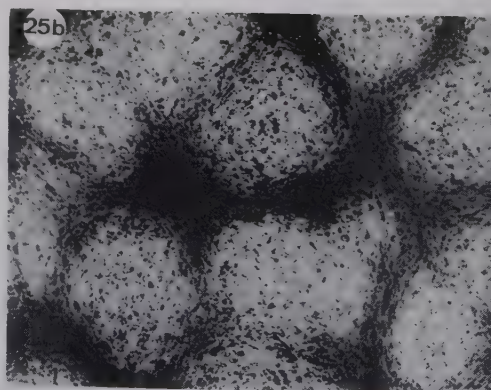
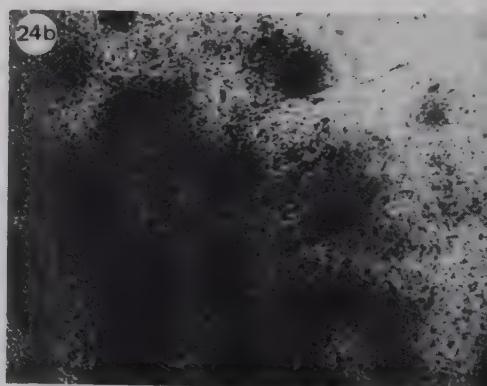
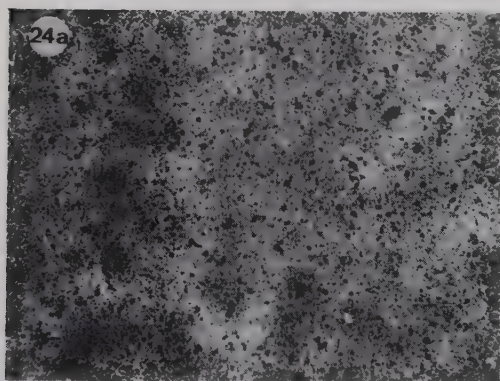
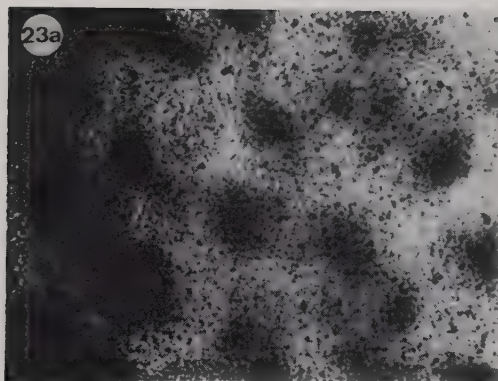
Abb. 19-22: Immunfluoreszenz-Färbungen gefrierageschnittener Mesenchymzellkulturen.

Abb. 19: gefärbt mit Kaninchen anti-Typ I Kollagen Antikörpern.
a) 72 h in Kultur; Vergr. 140x. b) 120 h in Kultur; Vergr. 140x.
c) 120 h in Kultur; Vergr. 360x.

Abb. 20: gefärbt mit Kaninchen anti-Fibronektin Antikörpern.
a) 72 h in Kultur; Vergr. 140x. b) 120 h in Kultur; Vergr. 140x.
c) 120 h in Kultur; Vergr. 360x.

Abb. 21: gefärbt mit Kaninchen anti-Typ V Kollagen Antikörpern.
a) 48 h in Kultur; Vergr. 140x. b) 120 h in Kultur; Vergr. 140x.

Abb. 22: gefärbt mit Ziegen anti-Typ III Kollagen Antikörpern.
120 h in Kultur; Vergr. 140x.



2. Der Einfluß eines Kokarzinogens auf die Knorpeldifferenzierung.

Morphologische Beobachtungen

Zur Untersuchung des Einflusses von PMA auf die Differenzierung wurden Mesenchymzellen in Medium mit 10^{-7} M PMA kultiviert. Während Kontrollkulturen zu Knorpel differenzierten (Abb. 23a,b) blockierte PMA die Chondrogenese vollständig (Abb. 24a). Wurde die PMA-Einwirkung nach 1 - 6 Tagen beendet, so nahmen die Zellen - mit einiger zeitlicher Verzögerung - ihr normales Differenzierungsprogramm wieder auf. Kulturen, die für 2-3 Tage in PMA-haltigem Medium kultiviert wurden, zeigten 5-6 Tage nach Rückkehr zu Normalbedingungen beträchtliche Knorpelentwicklung (Abb. 24b). Wurde die PMA-Behandlung länger als 6-8 Tage ausgedehnt, so verloren die Zellen in zunehmendem Maß die Fähigkeit zur Knorpeldifferenzierung. Diese Kulturen zeigten eine bemerkenswerte Musterbildung - vermutlich verursacht durch einen teilweisen Verlust der Kontaktinhibition. Die Zellen türmten sich hier zu vielschichtigen Zellhaufen auf, die sich ihrerseits zu einem "Netz" zusammenschlossen (Abb. 25a,b; die Dunkelfärbung des "Gitternetzes" durch Giemsa-Farblösung beruht auf der sehr hohen Zelldichte: diese Kulturen enthalten keine Knorpelzellen).

Abb. 23-25: Einfluß von PMA auf die Knorpeldifferenzierung von Mesenchymzellen. Giemsa-Färbungen; Vergr. 140x.

Abb. 23: Kontrolle: Zellen in normalem Kulturmedium differenzierten zu Knorpelaggregaten.
a) 72 h in Kultur. b) 104 h in Kultur.

Abb. 24a: Zellen, kultiviert für 72 h in Medium mit 10^{-7} M PMA, zeigten keine Knorpelbildung.

Abb. 24b: Zellen, kultiviert wie 24a), anschließend für weitere 144 h in normalem Medium, differenzierten zu Knorpelaggregaten.

Abb. 25: Zellen, kultiviert für 144 h (a) bzw. 216 h (b) in Medium mit 10^{-7} M PMA.
Es ist keine Chondrogenese eingetreten. Die Zellen haben sich - ähnlich transformierten Zellen - zu "Haufen" aufeinander-
getürmt, die sich ihrerseits zu einem Netz vereinigt haben.

Untersuchung der Kollagensynthese

Die Tabelle 2 zeigt den Einfluß von PMA auf die Kollagensynthese von Mesenchymzellen. Die PMA-Behandlung verursachte dabei eine wesentliche Erniedrigung des Anteils der Kollagensynthese an der Gesamtproteinsynthese.

Tab. 2: Der Einfluß von PMA auf die Kollagensynthese von Mesenchymzellen in Mikromassenkultur.

	^3H -Hydroxyprolin		Kollagensynthese	
	^3H - Prolin		Gesamtproteinsynthese	
	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 1	Experiment 2
Mesenchymzellen, kultiviert in Medium ohne PMA; 24-48 h in Kultur.	0,125	0,109	5,4%	4,7%
Mesenchymzellen, kultiviert in 10^{-7}M PMA; 24 - 48 h.	0,051	0,037	2,1%	1,5%

Mesenchymzellen wurden unter den angegebenen Bedingungen kultiviert und anschließend für 24 h in 2ml Kulturmedium, ergänzt durch 50 μCi ^3H -Prolin, 50 $\mu\text{g/ml}$ β -aminopropionitril und 100 $\mu\text{g/ml}$ Ascorbinsäure, markiert. Nach Säurehydrolyse wurden radioaktives Hydroxyprolin und Prolin am Aminosäureanalysator aufgetrennt.

Zur Charakterisierung des Kollagens wurden die Pepsin-abgebauten Proben durch SDS-Diskelektrophorese aufgetrennt, und die Bandenmuster densitometrisch ausgewertet. Mesenchymzellen synthetisierten in normalem Kulturmedium am zweiten Tag neben einem geringen Anteil von Typ V Kollagen nur Typ I Kollagen (Abb. 26a). Nach Einsetzen der Knorpeldifferenzierung dominierte die Typ II Kollagensynthese (Abb. 26b). Kulturen, in denen PMA die Chondrogenese blockierte, synthetisierten am zweiten und am fünften Tag neben wenig Typ V Kollagen ausschließlich Typ I Kollagen (Abb. 26c,d). In keinem von drei unabhängigen Experimenten wurde Typ II Kollagen in PMA-behandelten Kulturen nachgewiesen - eine Bestätigung der morphologischen Befunde. Wurden Zellen nach vier Tagen PMA-Behandlung

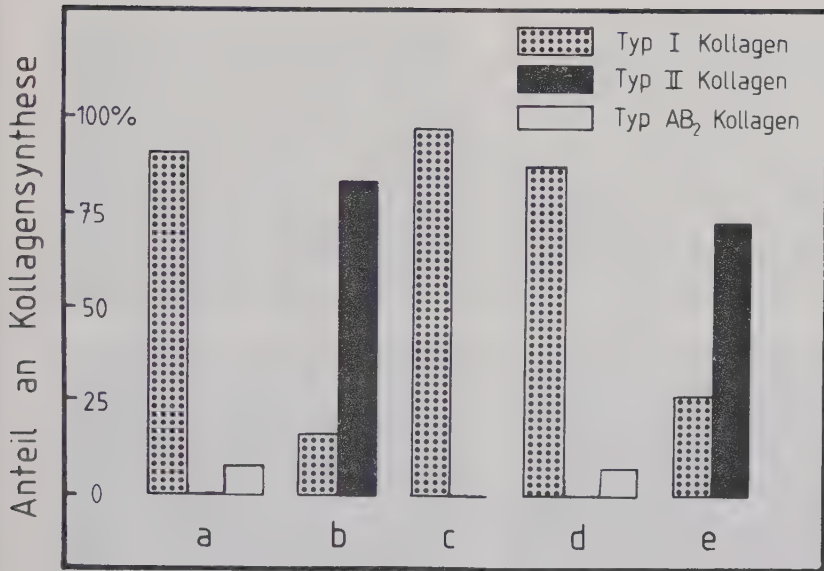


Abb. 26: Einfluß von PMA auf die Kollagensynthese von Mesenchymzellen - Schematische Darstellung der relativen Anteile der Kollagengtypen I, II und V (= AB₂).

Die Mikromassenkulturen wurden für 24 h mit ³H-Prolin markiert, Medium und Zellschicht vereinigt und mit Pepsin gespalten. Nach Auftrennung durch SDS-Diskelektrophorese auf einem 6% Gel wurden die Banden durch Fluorographie lokalisiert. Nach densitometrischer Auswertung (vergl. Abb. 10) wurden die Flächen unter den Banden planimetrisch bestimmt. Die Werte repräsentieren die Daten eines typischen Experimentes von drei gleichartigen. In keinem dieser Experimente wurde Typ II Kollagen in PMA-behandelten Kulturen nachgewiesen. Nach Absetzen von PMA betrug die am 7.Tag gemessene Typ II Kollagensyntheserate 74%, 59% bzw. 78% - Werte, die etwas unterhalb der von Kontrollkulturen lagen.

a,b) Kontrollkulturen in Normalmedium.

a) Markierungszeitraum: 24 - 48 h.

b) Markierungszeitraum: 96 -120 h.

c,d,e) Zellen, kultiviert in Medium mit 10⁻⁷M PMA.

c) Markierungszeitraum: 24 - 48 h.

d) Markierungszeitraum: 96 -120 h.

e) kultiviert für 96 h in Medium mit 10⁻⁷M PMA, dann für weitere 168 h in Normalmedium; markiert während der letzten 24 h.

in Normalmedium weiter kultiviert, so setzte Knorpeldifferenzierung nach vier bis fünf Tagen ein. Der Anteil der Synthese von Typ II Kollagen lag dabei nur etwas unterhalb der von Kontrollkulturen (Abb. 26e).

Immunfluoreszenzuntersuchungen

Während Mesenchymzellkulturen unter Normalbedingungen (vergl. Abb. 15a,b) ein geordnetes, dichtes Netzwerk der extrazellulären Matrixproteine aufbauten, unterdrückte PMA die Ausbildung der ECM. Nach drei Tagen in Kultur konnten Typ I Kollagen (Abb. 27a) und Fibronektin (Abb. 27b) nur in Spuren in der Zellschicht nachgewiesen werden.

Die Knorpeldifferenzierung wurde durch PMA vollständig unterdrückt - nach drei (Abb. 28a) bzw. nach sechs Tagen (Abb. 28b) konnte kein Typ II Kollagen in den Kulturen nachgewiesen werden.

Wurden PMA-vorbehandelte Zellen in normalem Medium weiter kultiviert, so deponierten sie wieder ein dichtes, extrazelluläres Netzwerk von Typ I Kollagen (Abb. 29a) und Fibronektin (Abb. 29b). Mit fortschreitender Kulturdauer wurde die Bildung von Zellaggregaten und der Beginn der Knorpeldifferenzierung beobachtet (Abb. 30a,b). Im Gegensatz zu normalen, unbehandelten Kulturen, bei denen Typ II Kollagen beim Einsetzen der Chondrogenese zuerst intrazellulär auftrat (vergl. Abb. 16a), wurde es hier sofort in extrazellulärer, teilweise faseriger Form deponiert (Abb. 30b).

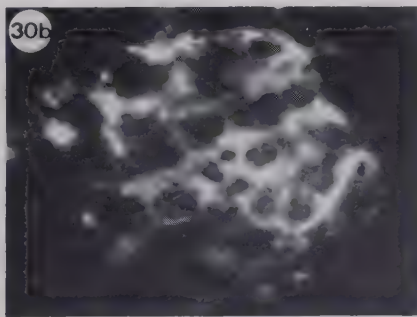
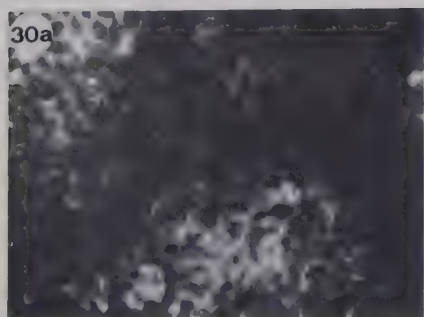
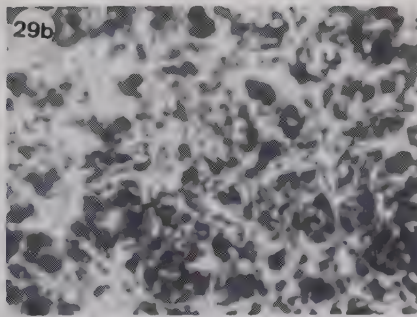
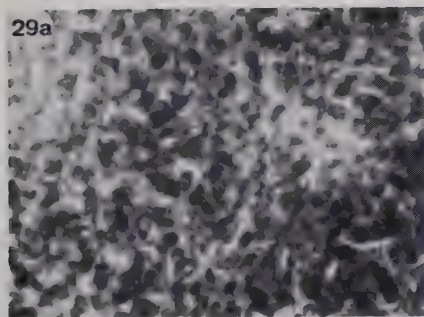
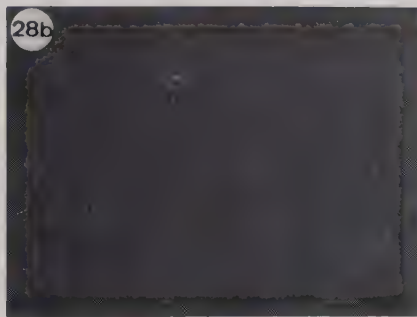
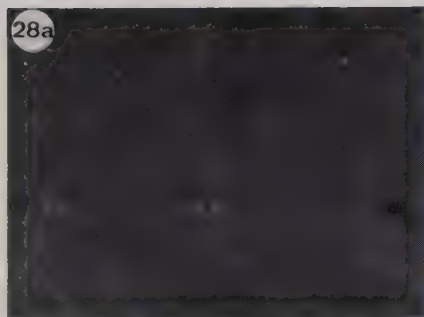
Abb. 27-30: Immunfluoreszenz-Färbungen PMA-behandelter Mesenchymzellen.

Abb. 27: kultiviert für 72 h in Medium mit 10^{-7} M PMA; Vergr. 140x.
a) gefärbt mit Kaninchen anti-Typ I Kollagen Antikörpern.
b) gefärbt mit Kaninchen anti-Fibronektin Antikörpern.

Abb. 28: gefärbt mit Kaninchen anti-Typ II Kollagen Antikörpern; Vergr. 140x.
a) 72 h in Kultur
b) 144 h in Kultur

Abb. 29: kultiviert wie Abb. 27, anschließend für weitere 48 h in Normalmedium; Vergr. 140x.
a) gefärbt mit Kaninchen anti-Typ I Kollagen Antikörpern.
b) gefärbt mit Kaninchen anti-Fibronektin Antikörpern.

Abb. 30: kultiviert wie Abb. 27 bzw. 28a, anschließend für weitere 104 h in Normalmedium; gefärbt mit Kaninchen anti-Typ II Kollagen Antikörpern.
a) Vergr. 140x.
b) Vergr. 360x.



Diskussion

Die biochemischen Untersuchungen zur Chondrogenese von Mesenchymzellen wurden mit dem von Ahrens et al. (1978) entwickelten System der Mikromassenkultur durchgeführt. Es wurde hier gezeigt, daß diese Kultivierungsmethode hohe, reproduzierbare Knorpeldifferenzierungsraten ermöglicht. Die Mesenchymzellen synthetisierten anfänglich Typ I Kollagen neben einem Anteil von etwa 5% Typ V Kollagen. Nach Einsetzen der Knorpeldifferenzierung wurde in zunehmendem Maß Typ II Kollagen synthetisiert - sein Anteil stieg bis auf etwa 85% an. Damit lag die erzielte Knorpeldifferenzierungsrate deutlich höher als die konventioneller Mesenchymzellkulturen (10-20% Typ II Kollagen) und kam der von Agarkulturen nahe (von der Mark und von der Mark, 1977).

Die biochemische Untersuchung der Bestandteile der ECM erfolgte dann mittels der Laktoperoxidase-katalysierten Jodierung. Diese Methode wird aus historischen Gründen - sie wurde zur Analyse der Komponenten der Erythrozytenmembran entwickelt (Hubbard und Cohn, 1972) - oft als "Zelloberflächen"-Jodierung bezeichnet. Angewandt auf Bindegewebszellen in Kultur erfasst sie neben den reinen "Zelloberflächen"-Proteinen jedoch auch die "extrazellulären" Strukturkomponenten der Matrix.

Bereits nach weniger als einem Tag in Kultur konnte Fibronectin als das vorherrschende extrazelluläre Protein von Mesenchymzellen nachgewiesen werden. Um die Möglichkeit auszuschließen, daß es sich bei dem jodierten Fibronectin nur um Protein handelte, daß aus dem fötalen Kälberserum von der Zelloberfläche bzw. der Matrix aufgenommen worden war, wurden Einbaustudien unternommen. Diese wiesen nach, daß Mesenchymzellen aktiv Fibronectin synthetisierten. Im Muster der Glykoproteine der Zellschicht und des Kulturmediums stellte es die

vorherrschende Bande, deren Identität mittels Immunpräzipitation nachgewiesen wurde. Diese Befunde sind in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Lewis et al. (1978) - diese Autoren hatten ein Glykoprotein vom Molekulargewicht 240 000 in Mesenchymzellkulturen gefunden, nicht jedoch die Identität mit Fibronectin gezeigt.

Weiterhin wurde mit fortschreitender Knorpeldifferenzierung die Expression eines extrazellulären Proteins mit dem "scheinbaren" Molekulargewicht von 180 000 beobachtet. Dieses Protein wurde auch in Chondrozytenkulturen, nicht jedoch in Kulturen PMA-behandelter Knorpelzellen gefunden. Es ist noch ungeklärt, ob dieses jodierbare, extrazelluläre Protein mit einem von Lowe et al. (1978) beschriebenen, chondrozytenspezifischen Protein identisch ist.

Die Deponierung der Strukturkomponenten der extrazellulären Matrix wurde mittels der indirekten Immunfluoreszenztechnik verfolgt. Bereits 14 - 18 Stunden nach Bildung von wirbelförmigen Mustern im Zellrasen färbten die ersten differenzierten Zellen im Zentrum dieser Aggregate positiv für Typ II Kollagen. Der Immunfluoreszenznachweis der Knorpeldifferenzierung war damit wesentlich empfindlicher als histologische Färbemethoden oder biochemische Bestimmungen der Typ II Kollagen Synthese.

Dem Einsetzen der Chondrogenese voraus ging die Deponierung eines dichten, extrazellulären Netzwerkes von Typ I Kollagen/Fibronectin. Dieses Netzwerk war - auf der Stufe des Lichtmikroskopes - in weiten Bereichen gleich verteilt und erinnerte an das extrazelluläre Geflecht konfluenten Fibroblastenkulturen. Nach Beginn der Knorpeldifferenzierung wurde das Typ I Kollagen/Fibronectin - Netzwerk in zunehmendem Maß abgebaut und durch die Bestandteile der Knorpelmatrix - Typ II Kollagen und Chondroitinsulfat-Proteoglykan - ersetzt.

Experimente, in denen die Immunhistologie mit Gefrier-Querschnitten von Mesenchymzellschichten durchgeführt wurde, erbrachten gleichlautende Befunde. Hierdurch wurde der mögliche Einwand entkräftet, das Nachlassen der Anfärbung für Typ I Kollagen und Fibronektin in den Knorpelknoten sei auf mangelndes Eindringvermögen der Enzym- bzw. Antikörperlösungen zurückzuführen. Die Ergebnisse dieser in vitro durchgeführten Experimente zeigen gute Übereinstimmung mit den in vivo erzielten Befunden, daß Fibronektin (Linder et al., 1975) bzw. das extrazelluläre Fibronektin/Typ I Kollagen - Netzwerk (Dessau et al., 1980) während der Knorpeldifferenzierung im Hühnerembryo abgebaut werden.

Mesenchymzellkulturen färbten für Typ III Kollagen nur vereinzelt - vorwiegend in peripheren Bereichen - an. Biochemisch wurde es bei einer Nachweisgrenze von 5% - 10% nicht aufgefunden. Typ V Kollagen hatte in undifferenzierten Mesenchymzellkulturen einen Anteil von 4% - 10% an der Gesamtkollagensynthese. Nach erfolgter Chondrogenese konnte es biochemisch erst bei längerer Exposition der Fluorogramme nachgewiesen werden. Die empfindliche Immunfluoreszenztechnik lokalisierte Typ V Kollagen dagegen in allen Stadien der Mesenchymzellkultur - aus der Intensität der Immunfluoreszenz lassen sich jedoch generell keine quantitativen Aussagen über die Syntheseraten von Kollagentypen erhalten (vergl. Herrman et al., 1980).

Die Beobachtung des Abbaues des Netzwerkes aus Typ I Kollagen/Fibronektin bei gleichzeitiger Deponierung von Typ II Kollagen und Chondroitinsulfat-Proteoglykan läßt die Frage nach der Regulation des Abbaues stellen. Eine Möglichkeit böte die Expression einer Typ I Kollagen-spezifischen Kollagenase und einer spezifisch Fibronektin degradierenden Protease nach Einsetzen der Knorpeldifferenzierung.

Wenn auch für das anders strukturierte Typ IV Kollagen der Basalmembran eine spezifische Kollagenase gefunden wurde (Liotta et al., 1979), so gibt es bisher keine Hinweise darauf, daß Typ I und Typ II Kollagen von Kollagenasen unterschiedlicher Spezifität angegriffen werden. Wahrscheinlicher ist es daher, daß der normale Proteinumsatz in Verbindung mit geänderten Syntheseraten zum Umbau der extrazellulären Matrix führt. Ein Abschalten der Synthese von Typ I Kollagen und Fibronektin, begleitet von einem Anschalten der Synthese von Typ II Kollagen und Chondroitinsulfat-Proteoglykan vermag - bei Fortdauer des normalen Proteinabbaues - die Umgestaltung der Matrix während eines Zeitraumes von 2 - 3 Tagen zu erklären.

Ein Vergleich der Befunde der Laktoperoxidase-katalysierten Jodierung der extrazellulären Proteine mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenzuntersuchungen dokumentiert eindrucksvoll den Wert immunhistologischer Methodik. Während das Jodierungsverfahren in Mesenchymzellkulturen verschiedenster Differenzierungsstadien stets Fibronektin als das vorherrschende extrazelluläre Protein auswies, zeigten die Immunfluoreszenzbefunde seinen Abbau in den Knorpelknoten. Der Unterschied erklärt sich daraus, daß das Ergebnis des biochemischen Nachweises aus den Anteilen des Zellkulturzentrums, der Peripherie und der Auswachszone gemittelt ist. Die Immunfluoreszenztechnik dagegen erlaubt die Unterscheidung zwischen dem Zentrum des Knorpelaggregates, in dem Typ I Kollagen/Fibronektin abgebaut werden und der Peripherie sowie der Auswachszone, in denen das Netzwerk aus Typ I Kollagen/Fibronektin erhalten bleibt. Die immunhistologische Methodik besitzt daher in heterogen zusammengesetzten Zellkultursystemen besonderen Wert.

Mit PMA wurde in diesen Untersuchungen erstmals eine Substanz beschrieben, die die Knorpeldifferenzierung von Mesenchymzellen für einen längeren Zeitraum zu hemmen vermag, ohne dabei das Potential zur Chondrogenese zu zerstören. Das in früheren Arbeiten untersuchte Bromdesoxyuridin (Levitt und Dorfman, 1972, 1973) und Vitamin A (Lewis et al., 1978) blockierte die Chondrogenese dagegen irreversibel. Mesenchymzellen, die bis zu 6 Tage in PMA-haltigem Medium kultiviert wurden, differenzierten nach Rückkehr zu Normalbedingungen in hohem Prozentsatz zu Knorpel.

Wirkte PMA länger ein, so wurde sein Einfluß auf die Chondrogenese in steigendem Maße irreversibel. Der zunehmende Verlust an Differenzierungspotential war auf morphologischer Ebene von einer Musterbildung im Zellrasen begleitet. Die Zellen türmten sich zu netzartigen Zellaggregaten aufeinander. Die Bildung solcher Zellhaufen - begünstigt durch den Verlust der Kontaktinhibition - ist eine lange bekannte Eigenschaft transformierter Zellen. PMA-behandelte Mesenchymzellen zeigten jedoch nicht die anderen charakteristischen Eigenschaften transformierter Zellen wie z.Bsp. Wachstum in Suspension oder in weichem Agar.

Neben der vollständigen Unterdrückung der Chondrogenese und der damit verbundenen Synthese des knorpelspezifischen Typ II Kollagens beeinflusste PMA auch den Aufbau der Matrix undifferenzierter Mesenchymzellkulturen. Der Anteil der Kollagensynthese an der Gesamtproteinsynthese war stark reduziert, die Auswahl der Kollagentypen jedoch nicht verändert: Auch PMA-behandelte, undifferenzierte Mesenchymzellen synthetisierten Typ I Kollagen neben einem geringen Anteil von Typ V Kollagen. Hiervon wurde offensichtlich nur sehr wenig abgelagert: Nur Spuren von Typ I Kollagen konnten in der Zellschicht mittels der

Immunfluoreszenztechnik nachgewiesen werden. Auch die Menge an Zelloberflächen- und Matrix-assoziiertem Fibronektin war stark vermindert.

Wurden Mesenchymzellkulturen nach 1 - 6 Tagen PMA-Behandlung wieder in Normalmedium kultiviert, so deponierten sie innerhalb von 48 h ein dichtes extrazelluläres Netzwerk von Typ I Kollagen/Fibronektin - analog zu dem unbehandelter Kulturen. Mit einiger zeitlicher Verzögerung - im Vergleich zu Kontrollkulturen - bildeten sich dann Zellaggregate, die später zu Knorpel differenzierten. Die ersten Chondrozyten zeichneten sich hierbei durch die extrazelluläre, faserige Ablagerung von Typ II Kollagen aus - im Gegensatz zu unbehandelten Kulturen, in denen die Knorpelzellen anfangs intrazelluläre Fluoreszenz zeigten.

Es ist noch unbekannt, wie PMA seinen Einfluß auf die Chondrogenese ausübt. Mesenchymzellen werden durch PMA nicht geschädigt; vitale Zellfunktionen wie z. Bsp. Zellwachstum oder Gesamtproteinsynthese werden kaum verändert. Seine deutlichste Wirkung zeigt sich in der Ausbildung der extrazellulären Matrix. Hier blockiert es die Deponierung des Typ I Kollagen/Fibronektin Netzwerkes, die den ersten Schritt des normalen Entwicklungsverlaufes darstellt.

Zusammenfassung

Gliedmaßenmesenchymzellen differenzieren in Mikromassenkultur in hohem Prozentsatz zu Knorpel. Anfänglich wird neben wenig Typ V Kollagen ausschließlich Typ I Kollagen synthetisiert. Nach Einsetzen der Chondrogenese erreicht die Synthese von Typ II Kollagen Werte von etwa 85%.

Mesenchymzellen synthetisieren in vitro Fibronectin; in der Zellschicht und im Kulturmedium ist es das vorherrschende Glykoprotein.

Die Zellen deponieren in vitro ein dichtes, extrazelluläres Netzwerk von Typ I Kollagen/Fibronectin. Dabei sind Typ I Kollagen und Fibronectin annähernd gleich verteilt. Nach Einsetzen der Knorpeldifferenzierung wird dieses Netzwerk in zunehmendem Maß wieder abgebaut und durch die Komponenten der Knorpelmatrix ersetzt.

PMA blockiert die Chondrogenese und die damit verbundene Synthese des knorpelspezifischen Typ II Kollagens. Dieser Einfluß ist reversibel; wirkt PMA allerdings länger als 8 Tage ein, so verlieren die Zellen ihr Differenzierungspotential.

PMA reduziert den Anteil der Kollagensynthese an der Gesamtproteinsynthese in undifferenzierten Mesenchymzellkulturen, ohne dabei die Auswahl der Kollagentypen - Typ I Kollagen neben wenig Typ V Kollagen - zu verändern. Es verhindert die Deponierung eines Netzwerkes von Typ I Kollagen/Fibronectin. Nach Rückkehr zu Normalbedingungen wird die normale Abfolge der Chondrogenese wieder aufgenommen: Ein dichtes extrazelluläres Netzwerk von Typ I Kollagen/Fibronectin wird aufgebaut; es bilden sich Zellaggregate, die später zu Knorpel differenzieren.

II. Das extrazelluläre Proteinmuster von differenzierten Knorpelzellen.

Einführung

In hyalinem Knorpel sind Chondrozyten umgeben von einer extrazellulären Matrix bestehend aus Typ II Kollagen und Proteoglykanen (zur Übersicht, siehe von der Mark und Conrad, 1979). Fibronektin, obwohl in undifferenziertem Mesenchym verbreitet, ist in differenziertem Knorpel nicht mehr vorhanden (Linder et al., 1975; Dessau et al., 1980). Werden Chondrozyten aus hyalinem Knorpel durch Enzymbehandlung frei gesetzt und in Monolayerkultur unter optimalen Bedingungen wachsen gelassen, so bilden sie epitheloide Kolonien, die wieder Knorpelmatrix anhäufen (Coon, 1966).

Charakteristische Merkmale von Chondrozyten *in vitro* sind die polygonale bis runde Zellform und die Synthese von Typ II Kollagen und Chondroitinsulfat-Proteoglykan. Knorpelzellen bewahren ihren Phänotyp, wenn sie in Suspensionskultur oder in Monolayerkultur in hoher Zelldichte ausgesät werden. Ausplattierung in mittlerer Zelldichte löst Abflachung aus und kann bei einem Teil der Zellen ein Fibroblasten-ähnliches Aussehen und eine Änderung der Genexpression bewirken (Holtzer und Abbott, 1968). Mit zunehmender Kulturdauer lassen sich immer mehr Typ I Kollagen-synthetisierende Zellen nachweisen, während die Zahl der Typ II Kollagen-produzierenden Zellen abnimmt. Der Übergang von Typ II auf Typ I Kollagen-synthese wurde sowohl biochemisch (Schiltz et al., 1973; Müller et al., 1975; Mayne et al., 1975) als auch durch Immunfluoreszenzanalyse an Einzelzellen festgestellt (Müller et al., 1975; von der Mark et al., 1977; Dessau et al., 1978). Umschaltung auf Typ I Kollagensynthese und Änderung der Zellform von polygonal zu fibroblastenähnlich sind dabei nicht notwendigerweise miteinander gekoppelt (von der Mark et al., 1977). Jedoch sind unter bestimmten Bedingungen nach etwa vier Wochen in Kultur nur noch fibroblastenähnliche, "dedifferenzierte" Zellen zu beobachten. Diese Kulturen synthetisieren neben Typ I Kollagen noch Anteile von Typ III und Typ V Kollagen (Müller et al., 1977; Benya et al., 1977).

Der Vorgang der "Dedifferenzierung" kann durch Bromdesoxyuridin (Abbott und Holtzer, 1968; Mayne et al., 1975) oder durch Embryoextrakt (Mayne et al., 1976) beschleunigt werden. Die durch Bromdesoxyuridin hervorgerufene Dedifferenzierung ist irreversibel; es sind bisher keine Kulturbedingungen bekannt, unter denen sie rückgängig gemacht werden kann. Die Frage nach der Reversibilität der Einwirkung von Embryoextrakt ist noch ungeklärt.

Zwei Möglichkeiten sind jedoch bekannt, den Phänotyp von Chondrozyten reversibel zu verändern. Lowe et al. (1978) beschrieben die Einwirkung von PMA auf differenzierte Knorpelzellen. Sie fanden den Übergang zu fibroblastenähnlichen Zellen und ein Abschalten der Synthese von Chondroitinsulfat-Proteoglykan. Nach Rückkehr zu Normalbedingungen wurde der Chondrozytenphänotyp wieder hergestellt. Pacifici et al. (1977) infizierten Knorpelzellen mit der temperaturempfindlichen Mutante des Rous Sarcoma Virus und beobachteten eine temperaturabhängige Beeinflussung der Zellmorphologie und der Synthese von Chondroitinsulfat-Proteoglykan. Diese zwei Möglichkeiten zur reversiblen Beeinflussung des Zellphänotyps sollen genutzt werden, um den normalen Verlauf der Ausbildung der Knorpelmatrix mit dem "gestörten" Vorgang zu vergleichen.

1. Differenzierte Knorpelzellen

Nach Freisetzen der Chondrozyten aus hyalinem Knorpel mittels Enzymbehandlung wurde ihnen in Monolayerkultur Gelegenheit gegeben, ihre extrazelluläre Matrix wieder auszubilden. Neben der Zelldichte übte das Serum den größten Einfluß auf die Ausprägung des Knorpelphänotyps aus. Je nach Serumcharge exprimierten die Chondrozyten ihren Phänotyp (Abb. 31a,c,e) oder erlitten teilweise "Dedifferenzierung" (Abb. 31b,d,f). Die Charge 373, die als erste zur Verfügung stand, wurde in den meisten Experimenten verwandt. Sie erlaubte es, in sehr niedriger bzw. sehr hoher Zelldichte die Expression des Knorpelphänotyps und in mittlerer Zelldichte die "Dedifferenzierung" zu beobachten (vergl. Lavietes, 1970).

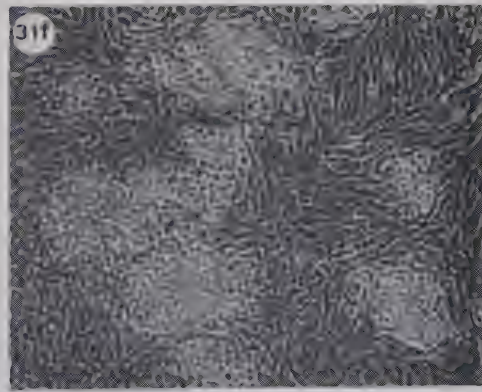
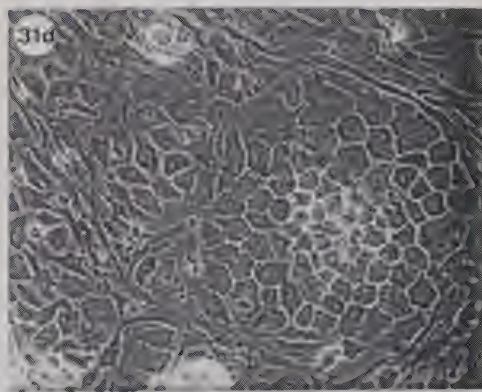
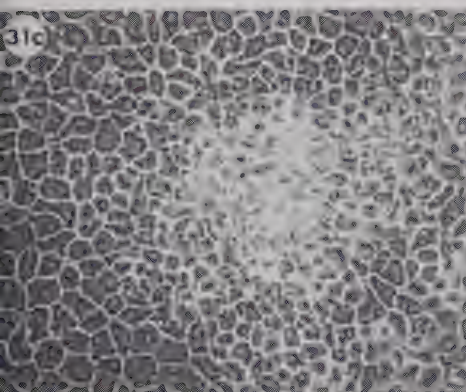
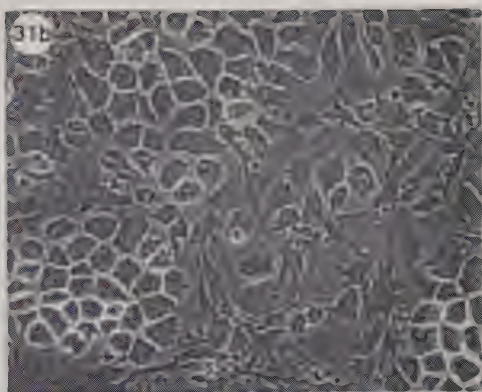


Abb. 31: Einfluss des fötalen Kalberserums (FCS) auf Morphologie und Koloniebildung von Knorpelzellen. Vergr.: a-d: 140x, e-f: 60x. Phasenkontrastaufnahmen. a, c, e: Bildung von Knorpelkolonien in Medium mit 10% FCS (Serumcharge Nr. 758, Seromed), am 5. (a) und 9. (c, e) Tag in Kultur aufgenommen. b, d, f: Wachstum von Knorpelzellen in Medium mit 10% FCS (Serumcharge Nr. 375, Seromed), am 5. (b) und 9. (d, f) Tag in Kultur aufgenommen.

Biochemische Untersuchung der extrazellulären Proteine

Die biochemische Untersuchung der extrazellulären Proteine erfolgte mittels der Laktoperoxidase-katalysierten Jodierung. Die Knorpelzellen wurden aus embryonalen Sterna isoliert und in Monolayerkultur in sehr hoher Zelldichte (5×10^6 Zellen/10cm Platte) kultiviert. Bereits nach drei Tagen, d.h. zu einem Zeitpunkt, zu dem noch keine Tendenz zur "Dedifferenzierung" feststellbar war, wurden die Zellen markiert. Fibronektin (Abb. 32a, markiert mit "A") erwies sich dabei als das vorherrschende extrazelluläre, jodierbare Protein in Chondrozyten-Monolayerkulturen.

Ein zweites extrazelluläres Protein (Abb. 32a, markiert mit "B") war ebenfalls in zu Knorpel differenzierten Mesenchymzellkulturen nachzuweisen (Abb. 32b). Dieses Protein wanderte in der SDS-Disk-elektrophorese etwas schneller als Myosin (Molekulargewicht: 200 000) und wurde wegen seines "scheinbaren" Molekulargewichtes von etwa 180 000 als 180 K Protein bezeichnet. Möglicherweise besteht eine Identität mit dem von Lowe et al. (1978) in Knorpelzellkulturen aufgefundenen Proteins gleicher Größe.

Nun sollte geprüft werden, ob Chondrozytenkulturen Fibronektin selbst synthetisierten, oder es nur aus dem Serum aufnahmen. Hierzu wurden Kulturen mit ^3H -Glukosamin markiert, und die Proteine auf der SDS-Diskelektrophorese aufgetrennt. Es zeigte sich, daß Chondrozyten in Monolayerkultur und in Suspension Fibronektin synthetisierten (Abb. 33a,c). Die Identität der Fibronektinbande wurde hierbei durch Immunpräzipitation festgestellt (Abb. 33b,d). Einen hohen Anteil im Präzipitat besaß dabei hochmolekulares, vernetztes Fibronektin (Abb. 33b,d; aufgehalten an der Grenzfläche zwischen Sammel- und Trenngel).

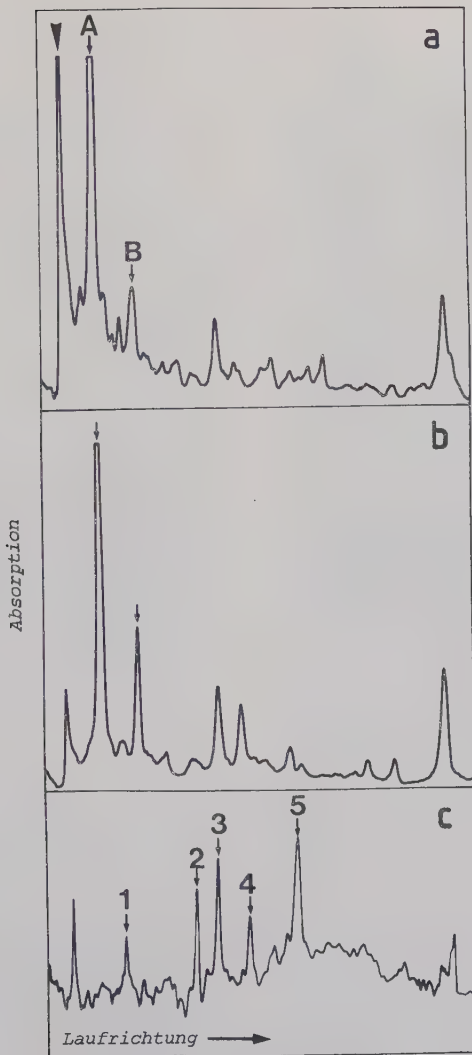


Abb. 32: Jodierung der extrazellulären Proteine in Knorpelzellkulturen.

Nach der Laktoperoxidase-katalysierten Markierung der extrazellulären Proteine mit ^{131}I wurde die Zellschicht in SDS-Probenpuffer gelöst, und die Proteine durch SDS-Diskelektrophorese in einem 6-18% linearen Gradienten von Acrylamid aufgetrennt. Nach autoradiographischer Lokalisierung wurden die Bandenmuster densitometrisch ausgewertet. Der große Pfeil ($\blacktriangledown$) bezeichnet die Grenzfläche zwischen Sammel- und Trenngel. "A" markiert die Position von Fibronectin, "B" die des 180 K Proteins.

- a) Chondrozyten, isoliert aus dem Sternum embryonaler Hühner; 72 h in Kultur.
- b) Mikromassenkulturen von Mesenchymzellen, 120 h in Kultur, zu einem hohen Prozentsatz zu Knorpel differenziert.
- c) Molekulargewichtsstandards (Bio-Rad): 1: Myosin (MW 200.000); 2: β -galaktosidase (MW 116.500); 3: Phosphorylase B (94.000); 4: Rinderserumalbumin (MW 68.000); 5: Ovalbumin (MW 43.000).

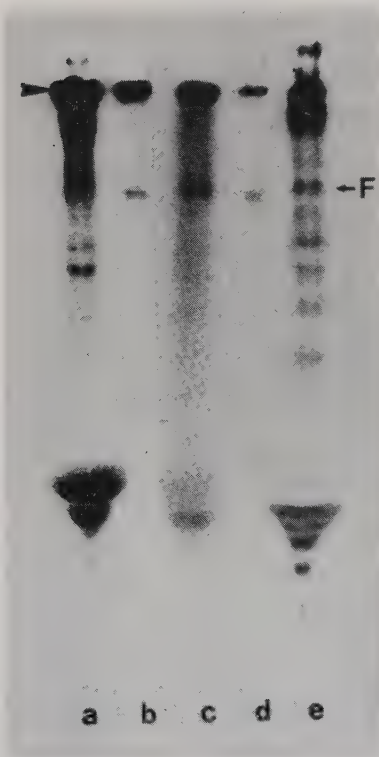


Abb. 33: Identifizierung von Fibronectin im Glykoprotein-Synthesemuster von Knorpelzellen.

Die Zellkulturen wurden in Medium mit $5 \mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Glukosamin für 14 h markiert. Die Mediumproteine wurden durch SDS-Disk-elektrophorese auf einem 5-18% linearen Gradienten von Acrylamid aufgetrennt, und die Bandenmuster fluorographisch lokalisiert.

- a) Kulturmedium von Chondrozyten in Suspension.
- b) Medium wie in a) , präzipitiert mit anti-Fibronectin Antikörpern.
- c) Kulturmedium von Chondrozyten im Monolayer.
- d) Medium wie in e) , präzipitiert mit anti-Fibronectin Antikörpern.
- e) Kulturmedium einer Monolayerkultur von Hühnersehnen-Fibroblasten.

Der Pfeil (▼) markiert die Grenzfläche zwischen Sammel- und Trenngel, "F" bezeichnet die Position von Fibronectin.

Da Fibronectin in hyalinem Knorpel nicht nachweisbar ist, Knorpelzellen in Kultur es jedoch synthetisierten, stellte sich die Frage, wann die Fibronektinsynthese aktiviert wurde. Frisch trypsinierte Chondrozyten wurden daher in Suspension gegeben und für verschiedene Zeiten mit ^{35}S -Methionin oder ^3H -Glycin markiert. Bereits 30 min nach der Freisetzung der Zellen aus der Knorpelmatrix wurde in den suspendierten Chondrozyten Typ II Prokollagen nachgewiesen (Abb. 34a, markiert mit "2"), das nach 1 h im Medium aufgefunden wurde (Abb. 34e). Vergleichbare Mengen von Fibronectin erschienen im Medium nach 2 h (Abb. 34f; markiert mit "1").

Typ II Prokollagen und Fibronectin wurden mittels Immunpräzipitation identifiziert (Abb. 35). Die Entscheidung, daß die Bande 2 Typ II Prokollagen - und nicht Typ II Kollagen - darstellte, wurde nach Vergleich mit einem Typ II Prokollagenstandard (Uitto, 1977) getroffen.

Abb. 34: Proteinsynthese- und Sekretion von Knorpelzellen in Suspension.

Nach der Trypsinierung wurden die Chondrozyten in Medium mit $20 \mu\text{Ci/ml}$ ^{35}S -Methionin in Suspension gehalten. Die zellulären- bzw. die ins Medium abgegebenen Proteine wurden durch SDS-Diskelektrophorese auf einem 5% Gel von Acrylamid aufgetrennt und fluorographisch lokalisiert.

a-c: Zelluläre Proteine.

a) 30 min in Suspension

b) 1 h in Suspension

c) 2 h in Suspension

d-g: Ins Medium sekretierte Proteine.

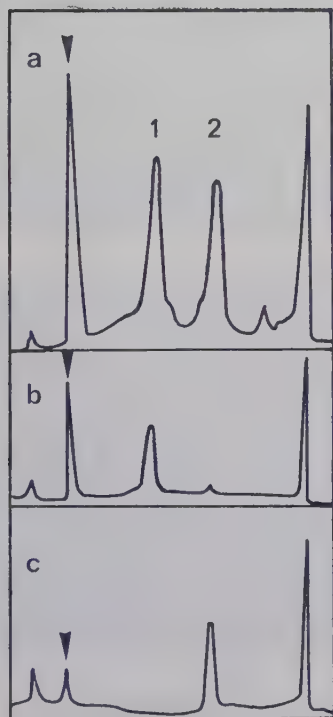
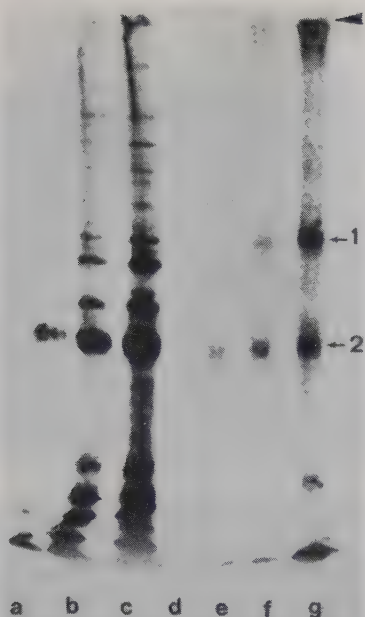
d) 30 min in Suspension

e) 1 h in Suspension

f) 2 h in Suspension

g) 20 h in Suspension

Der Pfeil ($\blacktriangledown$) markiert die Grenzfläche zwischen Trenn- und Sammelgel. "1" bezeichnet die Position von Fibronektin, "2" die von Typ II Prokollagen.



Laufrichtung $\longrightarrow$

Abb. 35: Immunpräzipitation der ins Medium einer Knorpelzellsuspension sekretierten Proteine.

Chondrozyten wurden nach dem Trypsinieren für 14 h in Medium mit $20 \mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Glycin in Suspension gehalten. Anteile des Kulturmediums wurden mit Kaninchen anti-Fibronektin bzw. anti-Typ II Kollagen, gefolgt von Ziegen anti-Kaninchen γ -Globulin präzipitiert. Die Präzipitate wurden in Elektrophoresepuffer gelöst und in der SDS-Diskelektrophorese - entsprechend Abb. 34 - aufgetrennt. Die Bandenmuster wurden fluorographisch lokalisiert und densitometrisch ausgewertet. Der Pfeil ($\blacktriangledown$) markiert die Grenzfläche zwischen Sammel- und Trenngel, "1" bezeichnet die Position von Fibronektin, "2" die von Typ II Prokollagen.

a) gesamtes Kulturmedium.

b) Präzipitat mit anti-Fibronektin Antikörpern.

c) " mit anti-Typ II Kollagen Antikörpern.



2. Der Einfluß eines Kokarzinogens auf differenzierte Knorpelzellen.

Morphologische Beobachtungen

Knorpelzellen, kultiviert in Normalmedium, zeigten die typische polygonale bis runde Zellform und bildeten differenzierte Knorpelkolonien mit runden Chondrozyten und metachromatisch färbender, extrazellulärer Knorpelmatrix (Abb. 36a,c,e).

In Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Lowe et al. (1978) nahmen Knorpelzellen in Kulturmedium mit 5×10^{-8} M PMA dagegen ein fibroblastenähnliches Aussehen an (Abb. 36b,d,f). Einige dieser Zellen entwickelten lange, dünne Zellfortsätze. Die Chondrozyten zeigten in PMA keine Kontaktinhibition der Zellwanderung; die Zellteilungsrate wurde angehoben.

Abb. 36: Einfluß von PMA auf Morphologie und Koloniebildung von Chondrozyten aus embryonalem Hühnerknorpel.

Phasenkontrastaufnahmen; Vergr. 360x; Serumcharge: 758.

a,c,e) Bildung einer Knorpelkolonie von Chondrozyten in Normalmedium; nach 3 (a), 5 (c) und 7 (e) Tagen in Kultur aufgenommen.

b,d,f) Wachstum von Chondrozyten in Gegenwart von 5×10^{-8} M PMA; nach 3 (b), 5 (d) und 7 (f) Tagen in Kultur aufgenommen.

Zeitverlaufsstudien

Die Beeinflussung des Knorpelphänotyps wurde bisher nur an sich teilenden Zellen durchgeführt (Abb. 36; vergl. Lowe et al., 1978). Es stellte sich jetzt die prinzipielle Frage, ob Mitose hierfür eine Voraussetzung darstellt (Abb. 37). Es wurde daher nach einer

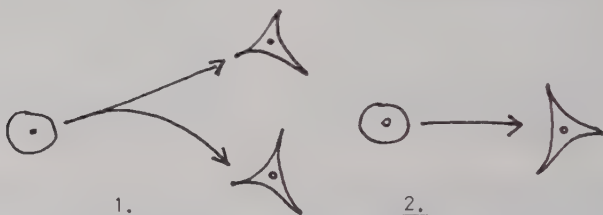


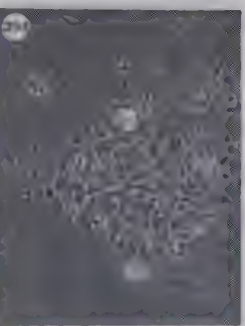
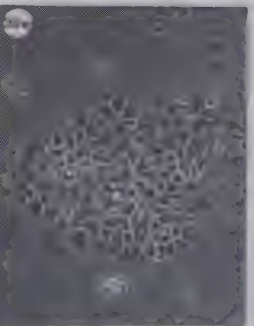
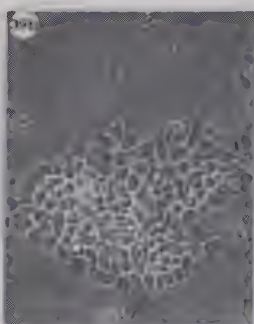
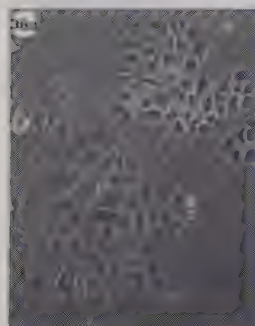
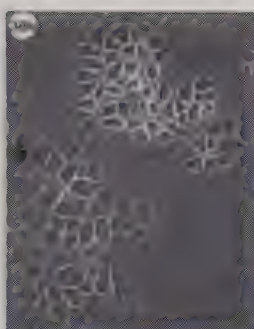
Abb. 37: Alternative Einwirkungsmöglichkeiten von PMA bei der Veränderung des Knorpelphänotyps.

- 1) Zellteilung bildet die Voraussetzung für eine Beeinflussung des Knorpelphänotyps.
- 2) PMA vermag auch den Phänotyp ruhender Zellen zu verändern.

Möglichkeit gesucht, die Einwirkung von PMA in Knorpelzellkulturen, in denen Zellteilung inhibiert war, zu studieren. Bei der Durchführung dieses Experimentes kam die Beobachtung zuhülfe, daß PMA in höheren Konzentrationen die Zellteilung blockieren kann. Wurden bereits ausgebildete Knorpelkolonien mit $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ PMA behandelt, so lösten sie sich in einzelne, fibroblastenähnliche Zellen auf (Abb. 38, 39). Die Zeitverlaufs-Fotographie zeigte dabei, daß von den in Abb. 37 diskutierten Alternativen auch die zweite verwirklicht wurde.

Abb. 38, 39: Einwirkung von PMA auf ausgebildete Knorpelkolonien.

Chondrozyten wurden 5 Tage in Normalmedium kultiviert und dann mit $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ PMA behandelt. Dieselbe Zellgruppe wurde nach 12 (b), 24 (c), 36 (d), 48 (e), und 60 (f) Stunden fotografiert. Die Abb. 38 und 39 stellen zwei getrennte Versuchsansätze dar.



Die Rückbildung des Knorpelphänotyps wurde von Lowe et al. (1978) in Sekundärkultur untersucht, d.h. die PMA-behandelten Zellen wurden trypsiniert und in Normalmedium ausplattiert. Diese Arbeitsweise bietet den Vorteil, daß die Zellen - in niedriger Dichte ausgesät - in hohem Prozentsatz den Knorpelphänotyp zurückbilden. Von Nachteil ist, daß ungewiß bleibt, ob nicht die Prozedur des Passagierens aufgrund unterschiedlicher Überlebens- und Anwachsrate die Anteile von vorhandenen Zellpopulationen verschiebt. Hier wurde daher die Wiederherstellung des Knorpelphänotyps in Primärkultur untersucht. Nachteilig wirkte sich hier die hohe Zelldichte aus, die - im Rahmen der normalen Dedifferenzierung - die Rückbildung eines Teils der Zellen verhinderte.

Nach Absetzen von PMA waren nach 4 Tagen bereits wieder polygonale Chondrozyten zu erkennen, die am 6. Tag differenzierte Knorpelkolonien mit runden Chondrozyten und metachromatisch färbender extrazellulärer Knorpelmatrix bildeten (Abb. 41, 42). Mitbedingt durch die hohe Zelldichte blieb daneben ein beträchtlicher Anteil an fibroblastenähnlichen Zellen erhalten. Diese Zeitverlaufsstudien zeigten eine Rückbildung des Knorpelphänotyps nach mehreren Zellgenerationen. Da bisher kein Inhibitor der Mitose zur Verfügung stand, der nicht selbst eine dedifferenzierende Wirkung auf Chondrozyten ausübte, bleibt es noch ungeklärt, ob die Wiederherstellung des Knorpelphänotyps der Zellteilung bedarf (Abb. 40).

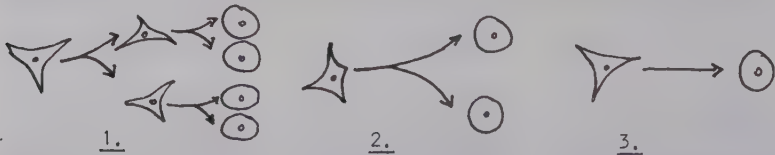
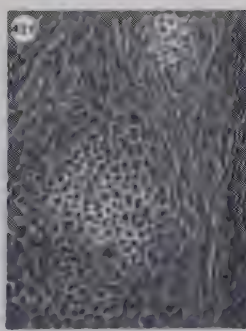
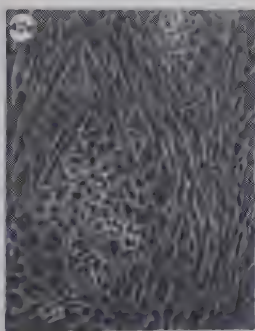
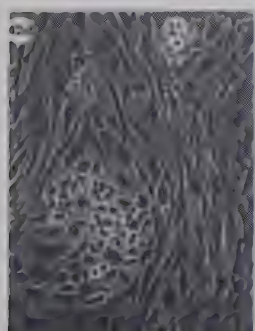


Abb. 40: 1. Alternative Möglichkeiten zur Rückbildung des Knorpelphänotyps.

2. 1) Die Rückbildung benötigt mehrere Zellgenerationen.
3. 2) Die Rückbildung erfordert eine Zellteilung.
- 3) Ohne Zellteilung wird der Phänotyp wiedererlangt.

Abb. 41, 42: Rückbildung des Knorpelphänotyps nach Absetzen von PMA.

Chondrozyten wurden 2 Tage mit $5 \times 10^{-8} \text{M}$ PMA behandelt und dann in Normalmedium wachsen gelassen. Dieselbe Zellgruppe wurde nach 1 (b), 2 (c), 3 (d), 4 (e) und 5 (f) Tagen aufgenommen.



Biochemische Untersuchung der extrazellulären Proteine

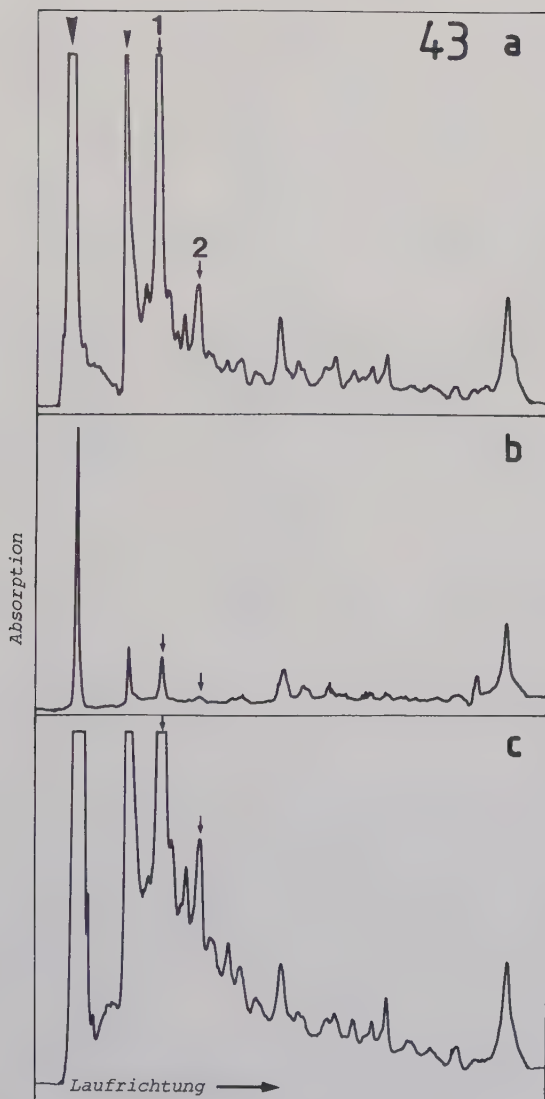
Zur Untersuchung des Musters der extrazellulären Proteine wurde die Laktoperoxidase-katalysierte Jodierung eingesetzt. Knorpelzellen, kultiviert in Normalmedium, exprimierten in beträchtlichem Umfang Fibronektin (Abb. 43a; markiert mit "1") und das 180 K Protein (Abb. 43a; markiert mit "2"). Nach PMA-Behandlung war die Menge des jodierbaren, extrazellulären Materials insgesamt stark vermindert (Abb. 43b); Fibronektin und das 180 K Protein waren davon in besonderem Maße betroffen. Fünf Tage nach Rückkehr zu normalen Kulturbedingungen war das Muster der extrazellulären Chondrozytenproteine wiederhergestellt (Abb. 43c).

Abb. 43: Der Einfluß von PMA auf die extrazellulären Proteine von Knorpelzellkulturen.

Nach der Laktoperoxidase-katalysierten Markierung der extrazellulären Proteine mit ^{131}I wurde die Zellschicht in SDS-Probenpuffer gelöst. (Die Menge des Probenpuffers war dabei der Zellzahl - bestimmt durch Trypsinieren einer Parallelplatte - proportional.) Ein Anteil hiervon wurde durch SDS-Diskelektrophorese in einem 6%-18% linearen Gradienten von Acrylamid aufgetrennt. Nach autoradiographischer Lokalisierung wurden die Bandenmuster densitometrisch ausgewertet.

Der große Pfeil (▼) bezeichnet die Oberfläche des Sammelgels, der kleine (▼) die Grenzfläche zwischen Sammel- und Trenngel. "1" markiert die Position von Fibronektin, "2" die des 180 K Protein.

- a) Chondrozyten in Normalmedium, 3 Tage in Kultur.
- b) Chondrozyten, kultiviert für 2 Tage in Normalmedium, dann für weitere 2 Tage in Medium mit $5 \times 10^{-8}\text{M}$ PMA.
- c) kultiviert wie b), anschließend für 5 Tage in Normalmedium.



Untersuchung der Kollagensynthese

Die Tabelle 3 zeigt den Einfluß von PMA auf die Kollagensynthese von Knorpelzellen. PMA erniedrigte dabei den Anteil der Kollagensynthese von etwa 13% auf 3%; nach Absetzen von PMA stieg sein Anteil wieder auf etwa 8% an.

Tabelle 3: Der Einfluß von PMA auf die Kollagensynthese von Knorpelzellen.

Verhältnis	$\frac{{}^3\text{H} - \text{Hydroxyprolin}}{{}^3\text{H} - \text{Prolin}}$		Kollagensynthese	
			Gesamtproteinsynthese	
	<u>Experiment 1</u>	<u>Exper. 2</u>	<u>Exper. 1</u>	<u>Exper. 2</u>
a) Chondrozyten, kultiviert für zwei Tage in normalem Medium.	0,301	0,253	14,7%	11,9%
b) Chondrozyten, kultiviert für zwei Tage in normalem Medium, dann für weitere zwei Tage in Medium mit $5 \times 10^{-8}\text{M}$ PMA.	0,069	0,081	2,9%	3,4%
c) Chondrozyten, kultiviert wie b), anschließend weitere 5 Tage in Normalmedium.	0,196	0,172	8,9%	7,7%

Knorpelzellen wurden unter den angegebenen Bedingungen kultiviert und anschließend für 24 h in 6 ml Kulturmedium, ergänzt durch 100 μCi ${}^3\text{H}$ -Prolin, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ β -aminopropionitril und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ascorbinsäure, markiert. Nach Säurehydrolyse wurden radioaktives Hydroxyprolin und Prolin am Aminosäureanalysator aufgetrennt.

Die Syntheserate des knorpelspezifischen Typ II Kollagens und die von Typ I Kollagen wurden mit einem Präzipitations - Radioimmunoassay bestimmt (Tabelle 4; Abb.44).

Tabelle 4: Syntheserate von Typ I und Typ II Kollagen in Kulturen normaler und durch PMA modifizierter Knorpelzellen.
Bestimmt durch Präzipitations-Radioimmunassay (von der Mark und von der Mark, 1977).

Chondrozyten wurden unter den angegebenen Bedingungen kultiviert und anschließend für 12 h in 3ml Kulturmedium, ergänzt durch 100 µCi ^3H -Prolin, 50 µg/ml β -aminopropionitril und 100 µg/ml Ascorbinsäure, markiert. Nach Vereinigung von Zellschicht und Medium und Dialyse gegen 1M NaCl, 0,05M Tris-HCl, pH 7,5, 0,002 M PMSF, wurden Anteile von 25 µl bzw. von 200 µl Extrakt mit 10 µl unverdünnten Meerschweinchen anti-Typ I bzw. anti-Typ II Kollagen Antikörpern, gefolgt von Ziegen anti-i-Meerschweinchen γ -Globulin Antikörpern, präzipitiert (vergl. Material und Methoden). Der Kontrollansatz zur Bestimmung von unspezifischer Präzipitation erhielt nur Meerschweinchen-Normalserum, Zellzahlen wurden an unmarkierten Parallelkulturen, Zählansbeuren mittels der Methode des inneren Standard gemessen.

	^3H -cpm im Präzipitat	Kontrolle ^3H -cpm im Präzipitat	^3H -cpm im Präzipitat -Kontrolle	für die Präzipitation verwandtes Aliquot (von insgesamt 4ml)	^3H -cpm präzipitiert je Kultur	Zählansbeute in %	^3H -dpm präzipitiert je Kultur	Zellzahl	dpm je Zelle
a) Chondrozyten, kultiviert für zwei Tage in normalem Medium.	Typ II: 44 508	5 054	39 454	200 µl	$7,89 \times 10^5$	19,28	$4,09 \times 10^6$	---	9,63
	Typ I: 9 429	---	4 375	200 µl	$8,75 \times 10^4$	23,94	$3,65 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	---
b) kultiviert für zwei Tage in normalem Medium, dann für weitere zwei Tage in Medium mit $5 \times 10^{-8}\text{M}$ PMA.	Typ II: 12 555	3 582	8 973	200 µl	$1,79 \times 10^5$	22,53	$7,97 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	0,54
	Typ I: 31 749	---	28 167	200 µl	$5,63 \times 10^5$	22,87	$2,46 \times 10^6$	---	1,67
c) kultiviert wie b), dann für weitere 5 Tage in Normalmedium.	Typ II: 91 157	11 283	79 874	25 µl	$1,28 \times 10^7$	20,24	$6,31 \times 10^7$	$1,08 \times 10^7$	5,86
	Typ I: 49 200	---	37 917	25 µl	$6,07 \times 10^6$	23,17	$2,62 \times 10^7$	---	2,43
d) kultiviert für 10 Tage in Normalmedium.	Typ II: 92 992	8 751	84 241	25 µl	$1,35 \times 10^7$	23,52	$5,73 \times 10^7$	$8,2 \times 10^6$	7,01
	Typ I: 31 855	---	23 104	25 µl	$3,70 \times 10^6$	21,13	$1,75 \times 10^7$	---	2,14

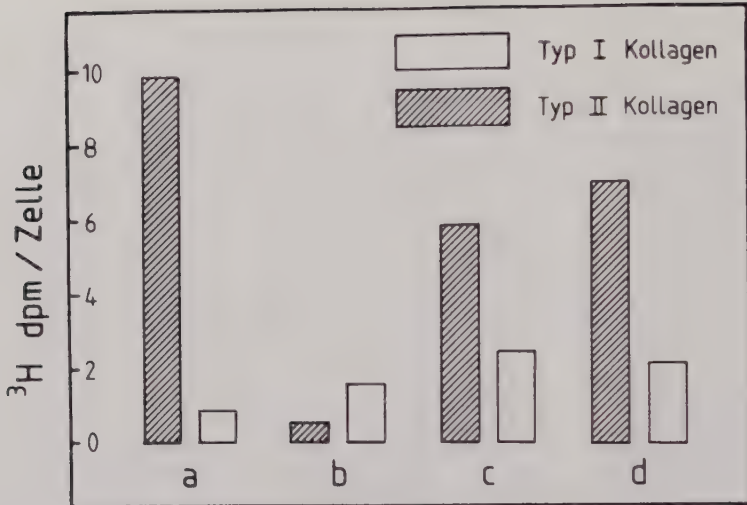


Abb. 44: Syntheserate von Typ I und Typ II Kollagen in Kulturen normaler und PMA-behandelter Knorpelzellen. Schematische Darstellung der in Tabelle 4 errechneten Syntheseraten pro Zelle.

- a) Chondrozyten, kultiviert für 2 Tage in normalem Medium.
- b) Chondrozyten, kultiviert für 2 Tage in normalem Medium, dann für weitere 2 Tage in Medium mit $5 \times 10^{-8} \text{M}$ PMA.
- c) Chondrozyten, kultiviert wie b), anschließend für weitere 5 Tage in Normalmedium.
- d) Chondrozyten, kultiviert für 10 Tage in normalem Medium.

Chondrozyten, kultiviert in Normalmedium, synthetisierten am dritten Tag in Kultur fast ausschließlich Typ II Kollagen (Abb. 44a). Nach 2 Tagen PMA-Behandlung sank die Typ II Kollagensynthese um den Faktor 18, während sich die Typ I Kollagensynthese zweifach erhöhte (Abb. 44b). Wurden PMA-behandelte Kulturen weiter in Normalmedium kultiviert, so stieg die Typ II Kollagensyntheserate an (Abb. 44c) und erreichte annähernd die Werte der Kontrollkulturen (Abb. 44d). Die Synthese von Typ I Kollagen lag dabei nur wenig höher als die der Kontrollkulturen.

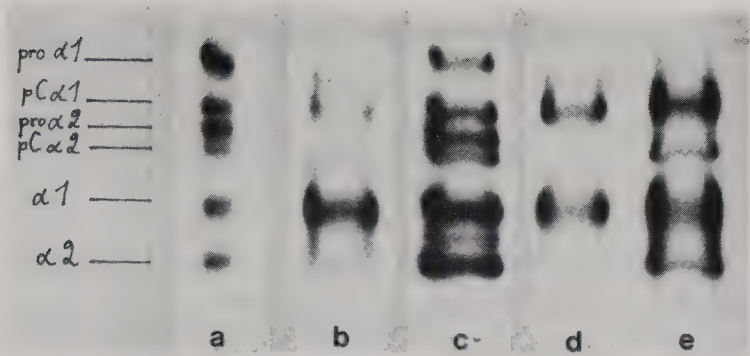


Abb. 45: Immunpräzipitation von Typ I und Typ II Prokollagen und Kollagen aus Extrakten von normalen und PMA-behandelten Knorpelzellkulturen.

Je 100, μ l der für den Präzipitations-Radioimmunsassay hergestellten Extrakte (Zellschicht + Kulturmedium) der Proben a und b (Tabelle 4; Abb. 44) wurden mit 5, μ l unverdünnter Meerschweinchen anti-Typ I bzw. anti-Typ II Kollagen Antikörper versetzt. Die Immunkomplexe wurden dann mittels einer Suspension von 10, μ l *Staphylococcus Aureus* Bakterien aus der Lösung isoliert und in Elektrophoresepuffer gekocht. Nach Auftrennung auf einem 6% Gel wurden die Banden fluorographisch lokalisiert.

- a) Standard Typ I Prokollagen/Kollagen, isoliert aus Calvarien.
- b,c) Extrakt aus Zellschicht und Kulturmedium von Chondrozyten, kultiviert für 2 Tage in normalem Medium.
Präzipitiert mit Meerschweinchen anti-Typ II Kollagen (b) bzw. anti-Typ I Kollagen (c) Antikörpern.
- d,e) Extrakt aus Zellschicht und Kulturmedium von Chondrozyten, kultiviert für zwei Tage in normalem Medium, dann für weitere zwei Tage in Medium mit 5×10^{-8} M PMA.
Präzipitiert mit Meerschweinchen anti-Typ II Kollagen (d) bzw. anti-Typ I Kollagen (e) Antikörpern.

Zur Prüfung auf Spezifität des Präzipitations-Radioimmunsassays wurden parallel hierzu weitere Immunpräzipitationen durchgeführt, und die erhaltenen Präzipitate auf der SDS-Diskelektrophorese aufgetrennt. Typ I und Typ II Prokollagen und Kollagen wurden hierbei spezifisch aus Extrakten von Kulturen normaler und PMA-behandelter Zellen gefällt (Abb. 45).

Um Schwankungen auszuschließen, die selbst innerhalb eines Experimentes zwischen Parallelkulturen auftreten können, wurde die Veränderung des Kollagensynthesemusters in einer Kultur beobachtet. Nach 2 Tagen in Normalmedium synthetisierten die Knorpelzellen fast ausschließlich Typ II Kollagen (Abb. 46; hierfür wurde eine Parallelkultur markiert). Die ausgewählte Chondrozytenkultur wurde anschließend für 4 Tage in Medium mit 5×10^{-8} M PMA und dann für weitere 5 Tage in Normalmedium wachsen gelassen; in Zeitabständen wurde sie dabei radioaktiv markiert.

Am 2.Tag der PMA-Behandlung trat im CM-Cellulosechromatogramm des ins Medium sekretierten Kollagens neben dem $\alpha 1$ -Peak ein Peak im Bereich der $\beta 1,2$ -Ketten auf (Abb. 47a,b). Nach Rückkehr zu Normalbedingungen stieg die Menge des ins Medium abgegebenen Kollagens stark an (Abb. 47c). Der $\alpha 1$ -Peak wurde wieder vorherrschend. Ein beträchtlicher Teil der Radioaktivität eluierte jedoch auch weiterhin im Bereich der $\beta 1,2$ -Ketten (Abb.47d).

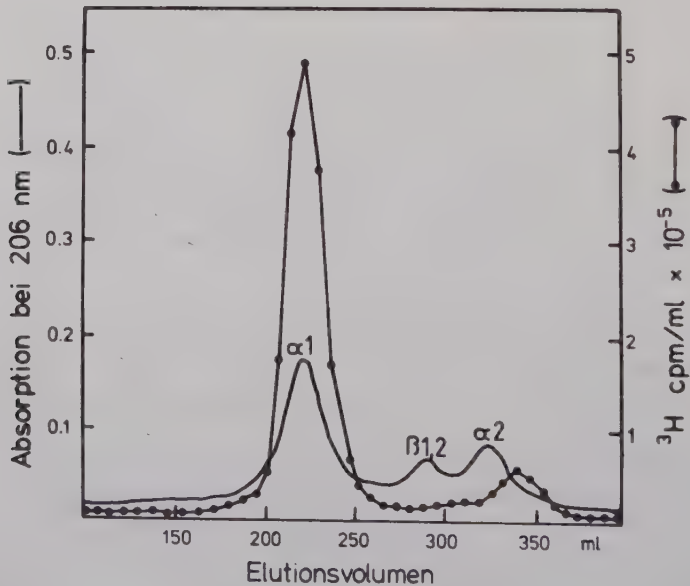


Abb. 46: CM-Cellulosechromatogramm des ^3H -markierten, Pepsin-behandelten Kollagens aus Zellschicht und Kulturmedium unbehandelter Knorpelzellen (-----), markiert zwischen 48-72 h in Kultur; durchgehende Linie: Träger Typ I Kollagen.

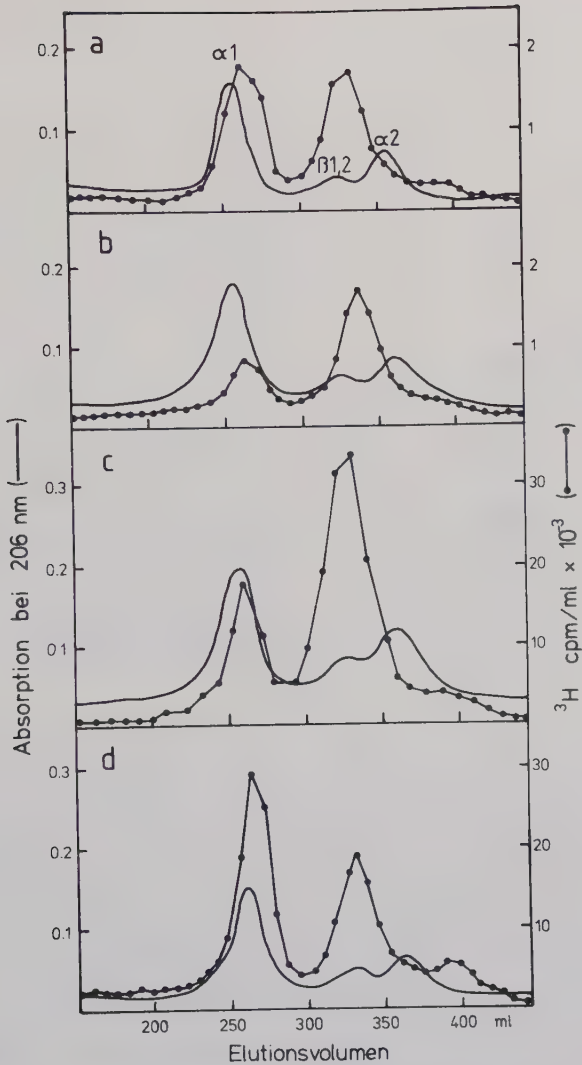
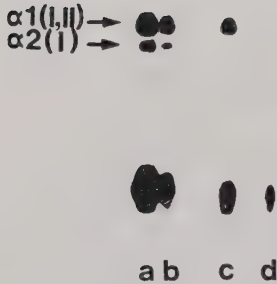


Abb. 47: CM-Cellulosechromatogramme des ³H-markierten, Pepsin-behandelten Kollagens (—•••••) aus dem Kulturmedium PMA-behandelter Chondrozyten; durchgehende Linie: Träger Typ I Kollagen aus lathyritischer Rattenhaut. Die Proben sind die markierten Kulturmedien einer Zellschicht.

Eine Chondrozytenkultur wurde für 2 Tage in normalem Medium gehalten, dann für 4 Tage in Medium mit 5×10^{-8} M PMA kultiviert und anschließend wieder 5 Tage in normalem Medium wachsen gelassen. Alle 24 h erfolgte Wechsel des Kulturmediums. Das Medium wurde durch 100 µg/ml Ascorbinsäure, 50 µg/ml β-aminopropionitril und 100 µCi ³H-Prolin zu folgenden Zeitpunkten ergänzt:

- am 2. Tag der PMA-Behandlung.
- am 4. Tag der PMA-Behandlung.
- am 2. Tag nach Absetzen der PMA-Behandlung.
- am 5. Tag nach Absetzen der PMA-Behandlung.

Abb. 48: SDS-Diskelektrophorese des ^3H -markierten, Pepsin-behandelten Kollagens im Kulturmedium PMA-behandelter Chondrozyten. Nach Auftrennung auf einem 6% Polyacrylamidgel wurden die Banden durch Fluorographie lokalisiert. Markierungsdauer: die letzten 24 h des angegebenen Zeitraumes.



- a) Chondrozyten, direkt ausplattiert und für 4 Tage kultiviert in Medium mit $5 \times 10^{-8}\text{M}$ PMA.
- b) Chondrozyten, für zwei Tage in Normalmedium, dann für weitere 2 Tage in Medium mit PMA kultiviert. (identisch mit der Probe von Abb. 47a)
- c) Chondrozyten, für zwei Tage in Normalmedium, anschließend für vier Tage in Medium mit PMA, dann für weitere fünf Tage in Normalmedium kultiviert. (identisch mit der Probe von Abb. 47d)
- d) Peak II (Elutionsvolumen 310 - 350ml) der CM-Cellulosechromatographie von Abb. 47d.

Die ins Kulturmedium sekretierten Kollagenketten wurden weiterhin durch SDS-Diskelektrophorese aufgetrennt. Am zweiten Tag der PMA-Behandlung war neben der $\alpha 1$ -Bande eine deutliche $\alpha 2(1)$ -Bande festzustellen (Abb. 48b). Der Anteil von Typ I Kollagen lag noch höher in Kulturen, die direkt nach dem Trypsinieren in Medium mit PMA ausplattiert wurden (Abb. 48a). Am 5. Tag nach Rückkehr zu Normalbedingungen wurden fast ausschließlich $\alpha 1$ -Ketten ins Medium abgegeben (Abb. 48c; eine schwache $\alpha 2(1)$ -Bande ist in der Reproduktion nicht sichtbar.).

Überraschend war der Befund, daß alle Kollagenproben PMA-behandelter Zellkulturen - auch diejenigen, die nach dem Absetzen von PMA erhalten wurden - einen hohen Anteil einer niedrig molekularen Spezies enthielten; diese wanderte in dem 6% Acrylamidgel mit einem R_f -Wert von etwa 0,85 (Abb. 48a-c). Sie konnte als das Material identifiziert werden (Abb. 48d), das in der CM-Cellulosechromatographie im Bereich der $\beta 1,2$ -Ketten eluierte (vergl. Abb. 47d).

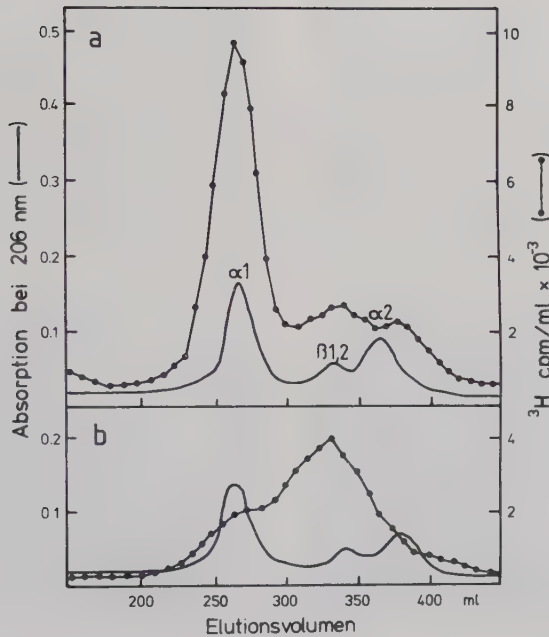


Abb. 49: Der Einfluß von höheren PMA-Konzentrationen auf die Kollagensynthese von Knorpelzellkulturen. CM-Cellulosechromatogramme des ³H-markierten, Pepsin-behandelten Kollagens aus der Zellschicht (a) und dem Kulturmedium (b). Die Chondrozyten wurden zwei Tage in Normalmedium kultiviert; 12 h nach dem Überführen in Medium mit 5×10^{-7} M PMA wurden sie für 24 h radioaktiv markiert.

Der Anteil dieses Produktes wurde durch höhere Konzentrationen von PMA erhöht. In Medium mit 5×10^{-7} M PMA wurde nach 12 h Vorinkubation im Kulturmedium in der Hauptsache dieses Material nachgewiesen (Abb. 49b). Das Muster der Kollagenketten in der Zellschicht zeigte sich hiervon weniger beeinflusst (Abb. 49a).

Immunfluoreszenzuntersuchungen

Eine Reihe von Immunfluoreszenzuntersuchungen beschäftigte sich mit dem Übergang von Typ II auf Typ I Kollagensynthese in Knorpelzellkulturen (Müller et al., 1975, 1977; von der Mark et al., 1977; Dessau et al., 1978). Die erhaltenen Ergebnisse sind hier - zum Vergleich mit den an PMA-behandelten und transformierten Zellen gewonnenen Befunden - noch einmal aufgeführt.

Typ II Kollagen läßt sich in polygonalen Chondrozyten intrazellulär nachweisen (Abb. 50). In älteren Kulturen wird es zunehmend in der extrazellulären Matrix abgelagert. Einhergehend mit morphologischen Anzeichen von "Dedifferenzierung" präzipitiert es auch in faseriger Form (Abb. 51). Den Beginn des Umschaltprozesses dokumentiert Abb. 52: Ein einzelner Chondrozyt innerhalb einer Knorpelkolonie zeigt Fluoreszenz für Typ I Kollagen. Mit fortschreitender Dedifferenzierung findet sich Typ I Kollagen vermehrt in intrazellulärer sowie in extrazellulärer, faseriger Form (Abb. 53). Während des Vorganges der Dedifferenzierung besteht eine beträchtliche Heterogenität innerhalb der Chondrozytenkulturen: Ausgebildete Knorpelkolonien finden sich neben Regionen mit dedifferenzierten, fibroblastenähnlichen Zellen (vergl. Abb. 31f).

Abb. 50 - 53: Immunfluoreszenz (a)- und Phasenkontrastaufnahmen (b) von Chondrozyten, kultiviert für 6 Tage in normalem Medium. Vergr. 720x.

Abb. 50,51: gefärbt mit Kaninchen anti-Typ II Kollagen Antikörpern.

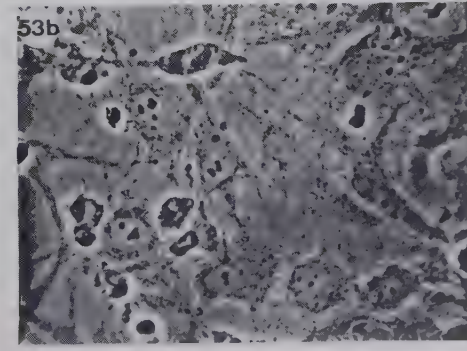
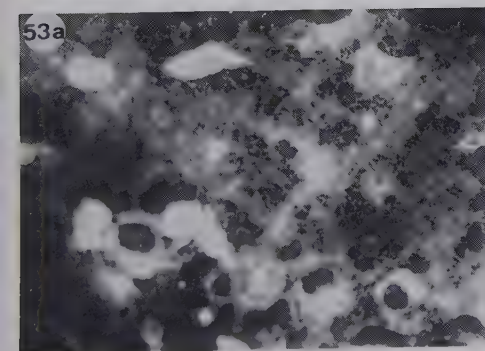
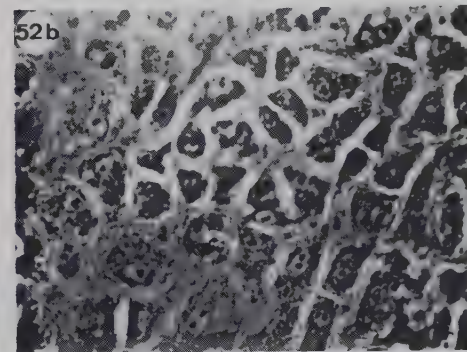
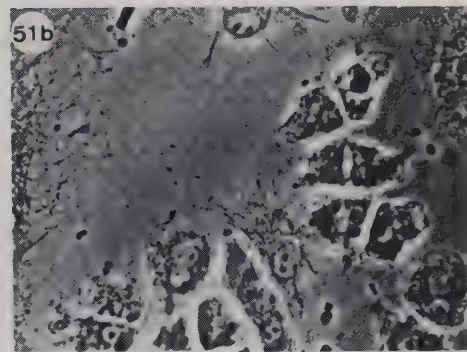
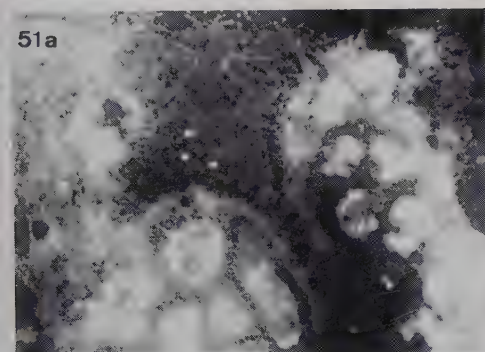
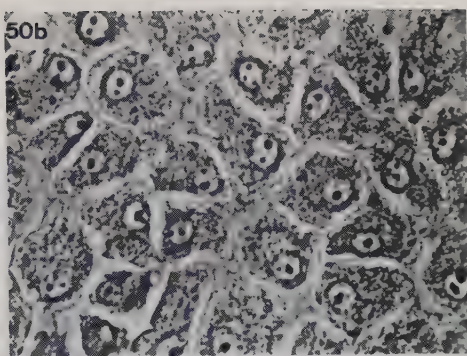
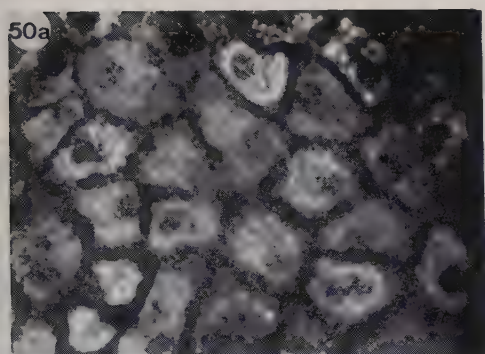
Abb.50: Zentrum einer gut ausgebildeten Chondrozytenkolonie.

Abb.51: Peripherie einer Chondrozytenkolonie mit Anzeichen von "Dedifferenzierung".

Abb. 52,53: gefärbt mit Kaninchen anti-Typ I Kollagen Antikörpern.

Abb.52: Zentrum einer Chondrozytenkolonie.

Abb.53: Peripherie einer Chondrozytenkolonie mit starken Anzeichen von "Dedifferenzierung".



Polygonale Zellen in einer Chondrozytenkolonie reagieren unterschiedlich mit anti-Typ III Kollagen Antikörpern: Einige Knorpelzellen zeigen mittelstarke, andere dagegen keine oder nur schwache Fluoreszenz (Abb. 54).

Nach diesen bekannten Befunden stellte sich die Frage nach der Lokalisierung der erst biochemisch nachgewiesenen Komponenten - Typ V Kollagen und Fibronektin. Mit Antikörpern gegen Typ V Kollagen zeigten typische Knorpelzellen eine starke, intrazelluläre Fluoreszenz (Abb. 55); etwas schwächer reagierte dabei die extrazelluläre Matrix. In "dedifferenzierten" Bereichen der Kultur bildete Typ V Kollagen dagegen ein faseriges, extrazelluläres Netzwerk aus (Abb. 55).

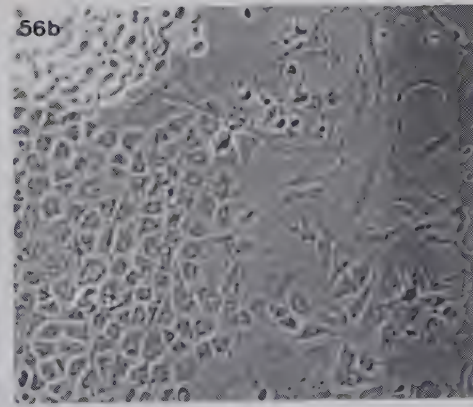
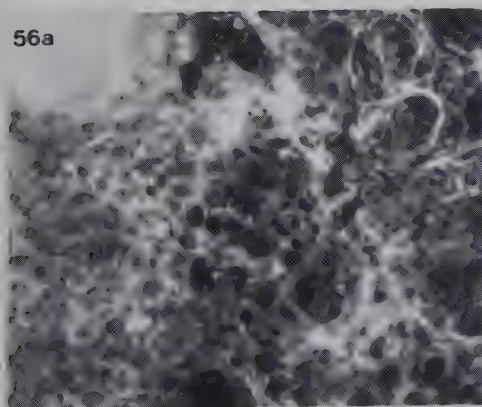
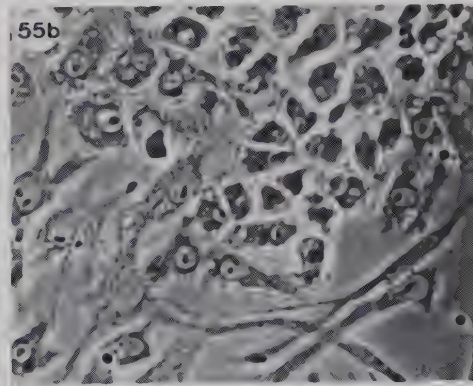
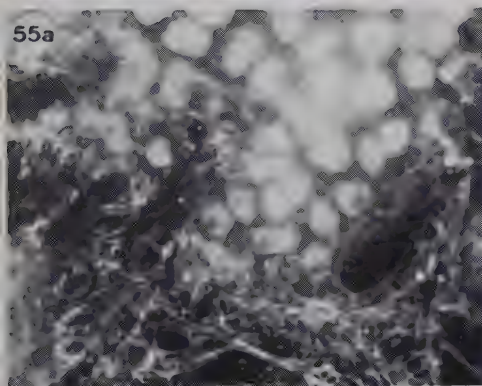
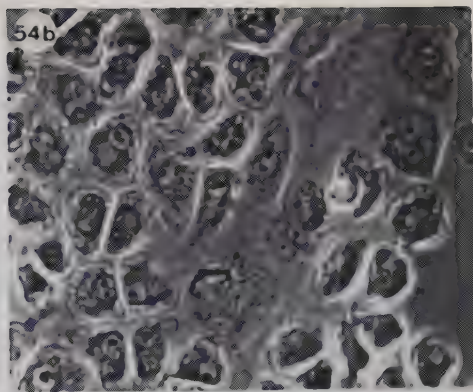
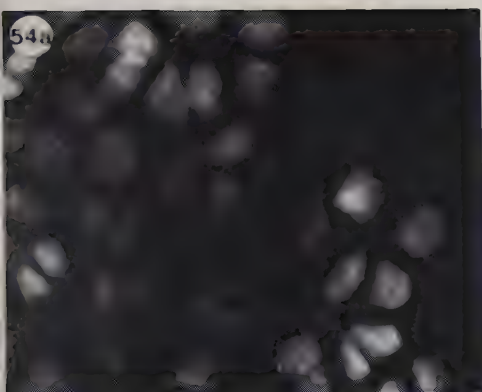
Fibronektin wurde in Knorpelkolonien interzellulär in Form von kurzen, die Zellen verbindenden Strängen nachgewiesen; in "dedifferenzierten" Regionen der Kultur war es in Gestalt langer, extrazellulärer Fasern abgelagert (Abb. 56; zur ausführlichen Darstellung, siehe Dessau et al., 1978).

Abb. 54-56: Immunfluoreszenz (a)- und Phasenkontrastaufnahmen (b) von Chondrozyten, kultiviert für 6 Tage in normalem Medium.

Abb. 54: gefärbt mit Ziegen anti-Typ III Kollagen Antikörpern.
Vergr. 720x.

Abb. 55: gefärbt mit Kaninchen anti-Typ V Kollagen Antikörpern.
Vergr. 720x.

Abb. 56: gefärbt mit Kaninchen anti-Fibronektin Antikörpern.
Vergr. 280x.



Fand sich in Knorpelzellkulturen unter Normalbedingungen vorwiegend intrazelluläres oder Matrix-gebundenes Typ II Kollagen (vergl. Abb. 50), so wurde es unter PMA-Behandlung innerhalb von $1\frac{1}{2}$ Tagen extrazellulär deponiert (Abb. 57). Einige Zellen, deren morphologische Veränderungen erst wenig fortgeschritten waren, zeigten noch eine schwache, diffuse, intrazelluläre Fluoreszenz.

Bei Fortsetzung der PMA-Behandlung wurde das extrazelluläre Netzwerk abgebaut. Nach 3 Tagen fluoreszierten nur noch wenige Fasern schwach für Typ II Kollagen (Abb. 58). In keiner Zelle konnte zu diesem Zeitpunkt mehr intrazelluläres Typ II Kollagen nachgewiesen werden.

Knorpelzellen, die kurzzeitig mit PMA behandelt wurden, exprimierten nach Rückkehr zu Normalbedingungen wieder Typ II Kollagen. Die Abb. 59 zeigt eine solche Chondrozytenkultur mit intrazellulärem und strahlenförmigen Typ II Kollagen - ein Muster, wie es charakteristisch ist für normale, runde, nicht abgeflachte Zellen. Auch in Knorpelzellkulturen, die für 3 Tage mit PMA behandelt wurden (vergl. Abb. 58) konnte 5 Tage nach Rückkehr zu Normalbedingungen wieder Typ II Kollagen nachgewiesen werden (Abb. 60).

Abb. 57-60: Expression des knorpelspezifischen Typ II Kollagens in PMA-behandelten Chondrozyten.

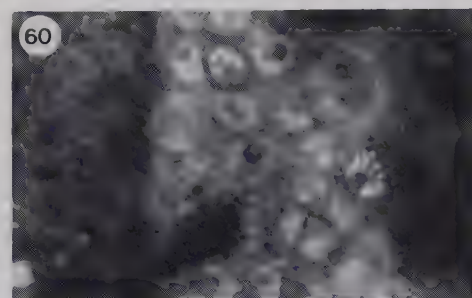
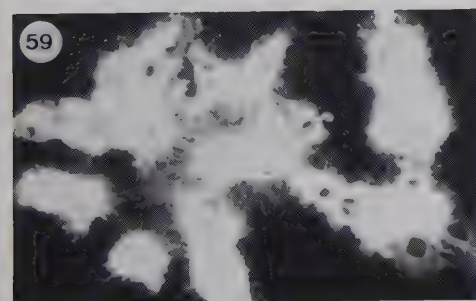
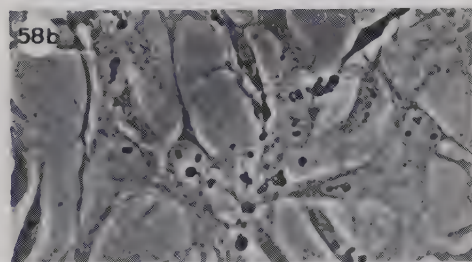
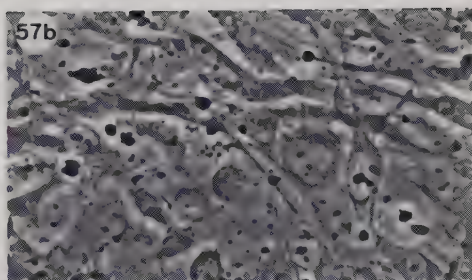
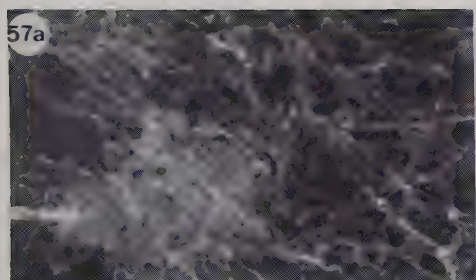
Immunfluoreszenz (a)- und Phasenkontrastaufnahmen (b); gefärbt mit Kaninchen anti-Typ II Kollagen Antikörpern. Vergr. 720x.

Abb. 57: Chondrozyten, kultiviert für zwei Tage in Normalmedium, dann für $1\frac{1}{2}$ Tage in Medium mit 5×10^{-8} M PMA.

Abb. 58: Chondrozyten, kultiviert für zwei Tage in Normalmedium, dann für drei Tage in Medium mit 5×10^{-8} M PMA.

Abb. 59: Chondrozyten, kultiviert für zwei Tage in Normalmedium, dann für 12 h in Medium mit 5×10^{-8} M PMA und anschließend für 2 Tage in Normalmedium.

Abb. 60: Chondrozyten, kultiviert für zwei Tage in Normalmedium, dann für drei Tage in Medium mit 5×10^{-8} M PMA und anschließend für 5 Tage in Normalmedium.



Typ I Kollagen (Abb. 61), Fibronektin (Abb. 62) und Typ V Kollagen (Abb. 63) bildeten in Kulturen PMA-behandelter Knorpelzellen ein faseriges, ungeordnetes Netzwerk aus. Die Intensität der Immunfluoreszenz war jedoch nur schwach.

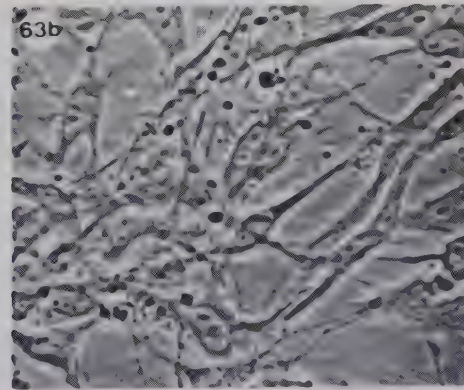
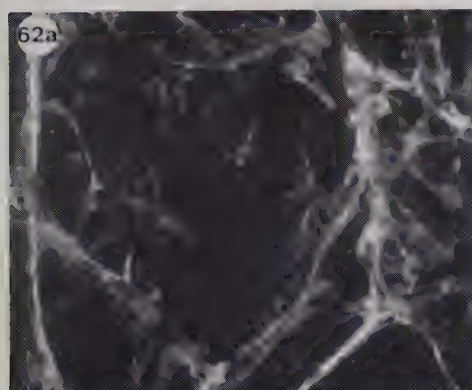
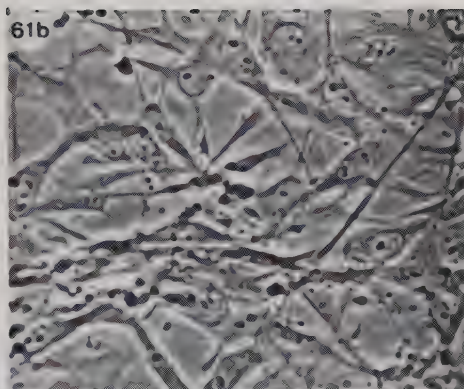
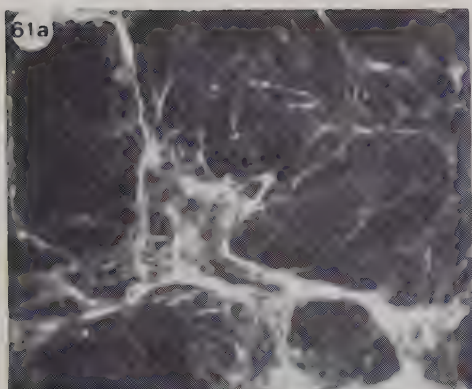
Abb. 61-63: Immunfluoreszenz (a)- und Phasenkontrastaufnahmen (b) PMA-behandelter Chondrozyten.

Die Knorpelzellen wurden für 2 Tage in Normalmedium, dann für weitere 3 Tage in Medium mit 5×10^{-8} M PMA kultiviert. Vergr. 720x.

Abb. 61: gefärbt mit Kaninchen anti-Typ I Kollagen Antikörpern.

Abb. 62: gefärbt mit Kaninchen anti-Fibronektin Antikörpern.

Abb. 63: gefärbt mit Kaninchen anti-Typ V Kollagen Antikörpern.



3. Der Einfluß von Virustransformation auf differenzierte Knorpelzellen.

Neben der Einwirkung von Kokarzinogenen stellt die Transformation mit temperaturempfindlichen Virusmutanten die zweite Möglichkeit dar, reversibel die Genexpression von Zellen zu verändern. Der Prozess der Transformation von Zellen durch RNA- oder DNA-Tumurviren wurde in der Vergangenheit intensiv untersucht mit dem Ziel, die biochemischen Gesetzmäßigkeiten zu erkennen, die zum abnormen Wachstum der Krebszellen führen. Charakteristische Eigenschaften transformierter Zellen sind neben geänderten Wachstumseigenschaften die abgerundete Zellform, der Verlust der Kontaktinhibition, geringes Anhaftvermögen zum Substrat und Veränderungen der Zelloberfläche (zur Übersicht, siehe Pastan und Willingham, 1978).

Die RNA der Hühnersarkomviren - diese Viren können in Tieren Sarcome hervorrufen und Zellen in Gewebekultur transformieren - trägt vier Gene, von denen "src" das für die Transformation verantwortliche ist (zur Übersicht, siehe Bauer, 1978). Temperaturempfindliche Transformationsmutanten (siehe z.Bsp. Wyke, 1973) ermöglichen es, den Einfluß des "src" Genes auf das Synthese- und Differenzierungsprogramm von Zellen zu untersuchen. Werden infizierte Zellen bei 36°C - der permissiven Temperatur - kultiviert, so wird das virale "src" Gen exprimiert; die charakteristischen Eigenschaften transformierter Zellen treten hervor. Hält man die Zellen dagegen bei 41°C, der nicht-permissiven Temperatur, so wird die Expression des viralen "src" Genes unterdrückt. Diese Zellen gleichen nach morphologischen und vielen biochemischen Kriterien normalen, nichtinfizierten Zellen.

Der Prozess der Transformation beeinflusst in starkem Maß die Zelloberflächen- und Matrixproteine. In einer Reihe von Veröffentlichungen

wurde gezeigt, daß transformierte Fibroblasten eine verminderte Menge von Fibronektin besitzen (Olden und Yamada, 1977; Vaheri und Ruoslahti, 1974; zur Übersicht, siehe Hynes et al., 1979). Es besteht allerdings kein genereller Zusammenhang zwischen der Verminderung von extrazellulärem Fibronektin und krankhaftem Zellwachstum: Mehrere menschliche Zellhybridlinien exprimieren in beträchtlichem Umfang extrazelluläres Fibronektin, ohne ihre tumorverursachende Fähigkeit verloren zu haben (Channing und Stanbridge, 1978).

Nur wenige Untersuchungen beschäftigten sich bisher mit dem Einfluß von transformierenden Sarcomviren auf die Expression von Kollagen. In Fibroblastenzellkulturen war die Kollagensynthese stark erniedrigt (Levinson et al., 1975; Kamin und Rubin, 1977). Die Transformation blockierte auch die Umwandlung von Prokollagen zu Kollagen (Arbogast et al., 1977) und führte zum Verlust von Matrix-gebundenem Fibronektin und Prokollagen (Vaheri et al., 1978).

Untersuchungen an Knorpelzellen zeigten, daß die Transformation die Menge an Zellschicht-gebundenen Glykosaminoglykanen drastisch reduziert (Takagaki und Toole, 1979). Weiterhin verhindert die Transformation die Expression des Chonrozyten-spezifischen Chondroitin-sulfat-Proteoglykans (Pacifci et al., Muto et al., 1977). Veröffentlichungen über das Kollagen- und Fibronektinmuster transformierter Knorpelzellen sind nicht bekannt. Hier soll daher die temperaturabhängige Transformation als "Störung" benutzt werden, um die Expression der Matrixkomponenten Kollagen und Fibronektin reversibel zu beeinflussen.

Untersuchung der Kollagensynthese

Die Tabelle 5 zeigt den Einfluß der Expression des transformierenden "src" Genes auf die Kollagensynthese. Der Anteil der Kollagensynthese an der Gesamtproteinsynthese verringerte sich hierbei um den Faktor 2,7. Transformierte Knorpelzellen, kultiviert bei der permissiven Temperatur (36°C), synthetisierten somit deutlich weniger Kollagen als Knorpelzellen "normalen" Phänotyps, gehalten bei der nicht-permissiven Temperatur (41°C).

Tabelle 5: Der Einfluß der Expression des "src" Genes auf die Kollagensynthese von Knorpelzellen.

Verhältnis	^3H - Hydroxyprolin	Kollagensynthese
	^3H - Prolin	Gesamtproteinsynthese
Chondrozyten, kultiviert bei der nicht-permissiven Temperatur (41°C).	0,225	10,4%
Chondrozyten, kultiviert bei der permissiven Temperatur (36°C).	0,0896	3,8%

Chondrozyten, infiziert mit der temperaturempfindlichen Mutante des Rous Sarcoma Virus, wurden während zweier Passagen bei 41°C bzw. bei 36°C gehalten. Die Kulturen wurden dann für 8 h mit 6 ml Kulturmedium, ergänzt durch 100 µCi ^3H -Prolin, 50 µg/ml β-Aminopropionitril und 100 µg/ml Ascorbinsäure, markiert. Nach Säurehydrolyse wurden radioaktives Hydroxyprolin und Prolin am Aminosäureanalysator aufgetrennt.

Zur Charakterisierung des Kollagens wurde ein Anteil der ^3H -markierten, Pepsin-behandelten Proben durch CM-Cellulosechromatographie aufgetrennt. Das aus der Zellschicht bei 41°C gehaltener Kulturen extrahierte Kollagen eluierte im Bereich der $\alpha 1$ -Kette mit Nebenpeaks im Bereich der $\beta 1,2$ - und hinter der $\alpha 2$ -Kette (Abb. 64a). Zellen, kultiviert bei 36°C , ergaben ein analoges Muster; der Anteil des bei höherer Ionenstärke eluierten Materials war allerdings niedriger (Abb. 64b).

Das ins Kulturmedium bei 41°C und 36°C abgegebene Kollagen zeigte ein unerwartetes Verhalten: Der Hauptanteil eluierte vor der $\alpha 1$ -Kette (Abb. 65a,b).

Zur weiteren Charakterisierung wurden die Pepsin-abgebauten Proben durch SDS-Diskelektrophorese aufgetrennt. In der Zellschicht fand sich dabei vorwiegend Typ II Kollagen mit unterschiedlichen Anteilen von Typ V Kollagen (Abb. 66a,c). Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Ionenaustauscherchromatographie (Abb. 64), in der die Hauptmenge des Materials im Bereich der $\alpha 1$ -Kette eluierte.

Die unerwarteten Eigenschaften des ins Kulturmedium abgegebenen Kollagens (Abb. 65) zeigten sich auch in der SDS-Diskelektrophorese (Abb. 66b,d), in der es etwas langsamer als eine Standard $\alpha 1(\text{II})$ -Kette wanderte.

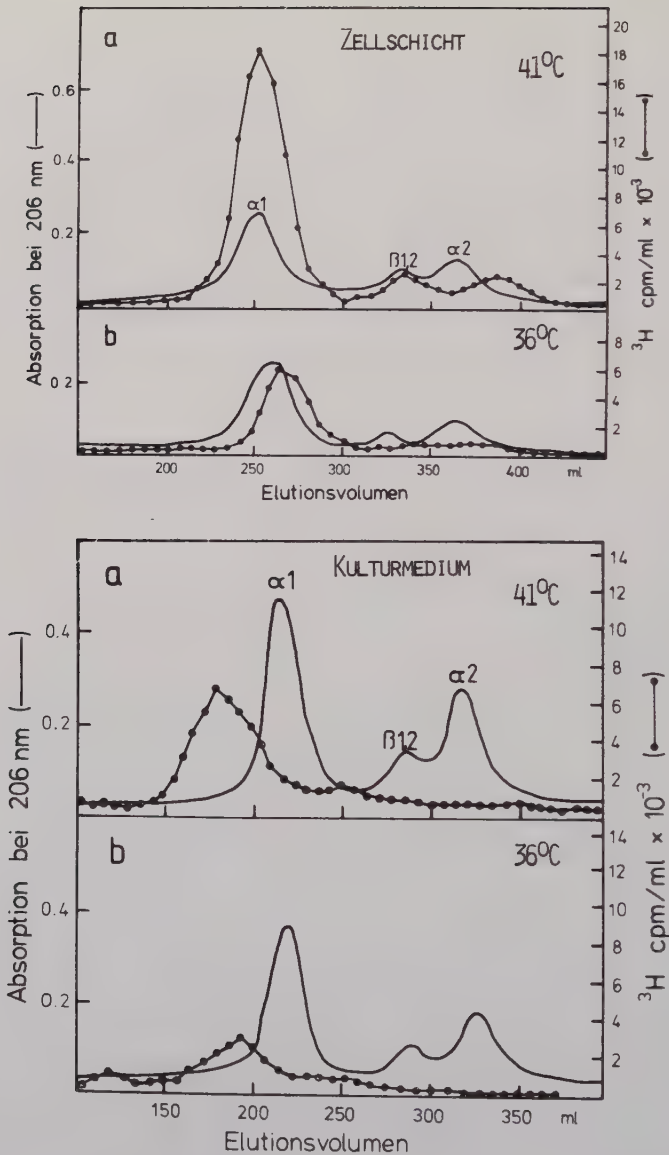


Abb. 64, 65: CM-Cellulosechromatogramme des ^3H -markierten, Pepsin-behandelten Kollagens (—•••••) aus der Zellschicht (Abb. 64) bzw. dem Kulturmedium (Abb. 65) von Chondrozyten, infiziert mit der temperaturempfindlichen Mutante des Rous Sarcoma Virus. Vor der Markierung wurden die Zellen für zwei Passagen bei 41°C (a) bzw. bei 36°C (b) wachsen gelassen. Die durchgehende Linie stellt das Elutionsprofil von Träger Typ I Kollagen aus lathyritischer Rattenhaut dar.

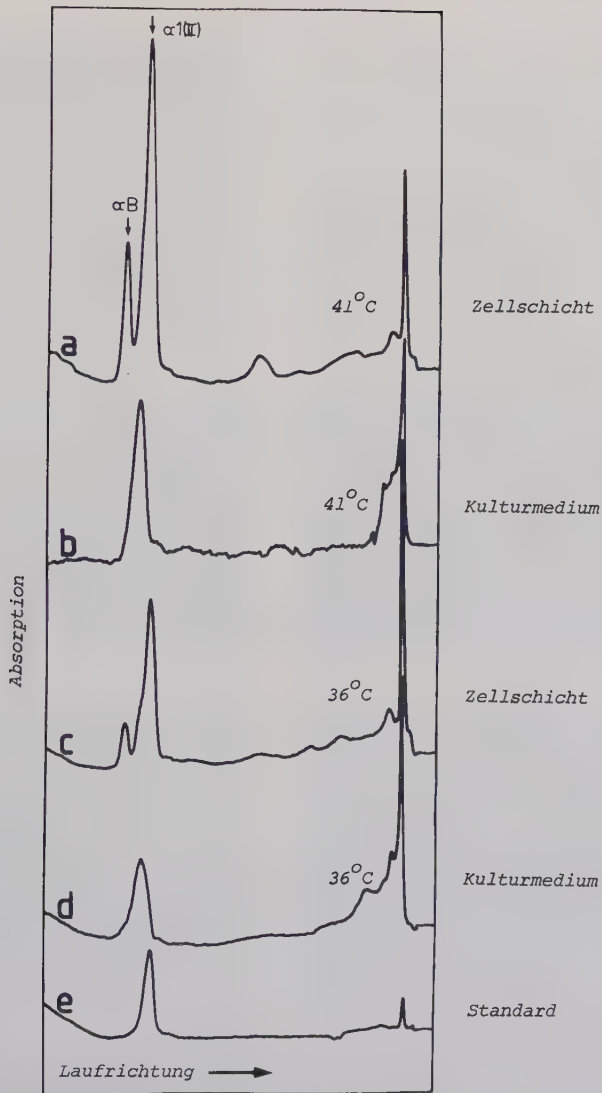


Abb. 66: SDS-Diskelktrophorese des ^3H -markierten, Pepsin-behandelten Kollagens von Chondrozyten, infiziert mit der temperaturempfindlichen Mutante des Rous Sarcoma Virus.

Nach Auftrennung auf einem 6% Polyacrylamidgel wurden die Banden fluorographisch lokalisiert und densitometrisch ausgewertet.

a,b) Chondrozyten, kultiviert für zwei Passagen bei 41°C.

a) Zellschicht. b) Kulturmedium.

c,d) Chondrozyten, kultiviert für zwei Passagen bei 36°C.

c) Zellschicht. d) Kulturmedium.

e) Standard: $\alpha 1(II)$ -Kette, synthetisiert von normalen Hühnerchondrozyten, gereinigt durch CM-Cellulosechromatographie.

Immunfluoreszenzuntersuchungen

Virus-infizierte Chondrozyten, gehalten bei 41°C, der nicht-permissiven Temperatur, waren in Bezug auf Morphologie und Lokalisierung der Matrixproteine fast ununterscheidbar von normalen, nicht-infizierten Zellen.

Typ II Kollagen (Abb. 67) und Typ V Kollagen (Abb. 68) wurden Intrazellulär nachgewiesen. Fibronektin war neben Intrazellulärer Verteilung in Form kurzer, Zellen verbindender Fasern angeordnet (Abb. 69). Typ I Kollagen wurde nicht aufgefunden (Abb. 70). Dagegen zeigten einzelne Zellgruppen intrazelluläre Fluoreszenz für Typ III Kollagen (Abb. 71).

Abb. 67-71: Immunfluoreszenz (a)- und Phasenkontrastaufnahmen (b) von Chondrozyten, infiziert mit der temperaturempfindlichen Mutante des Rous Sarcoma Virus; kultiviert für zwei Passagen bei 41°C. Vergr. 560x.

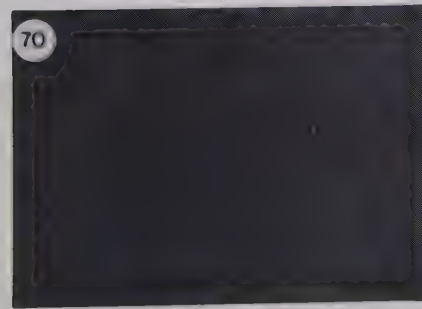
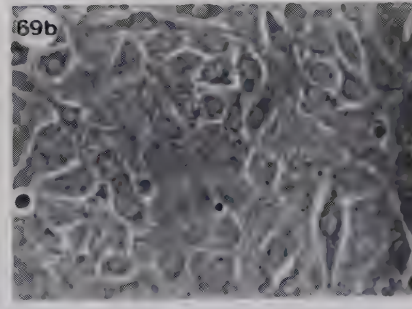
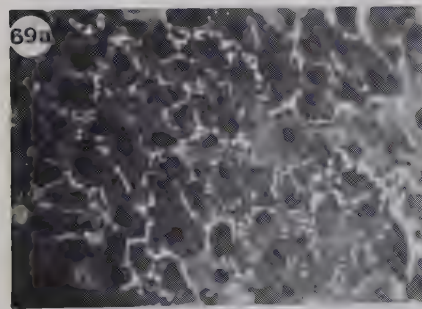
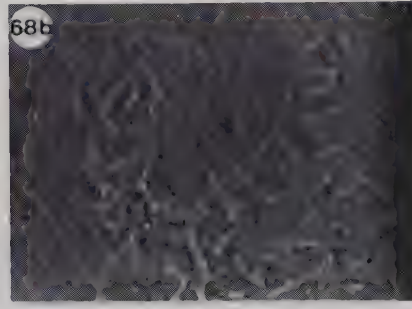
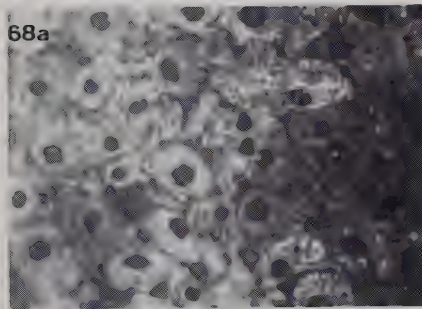
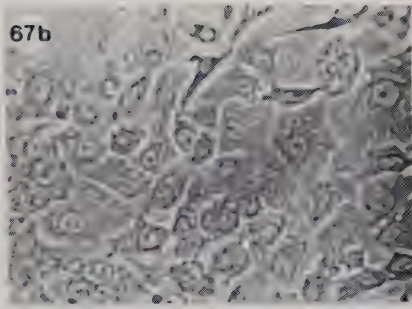
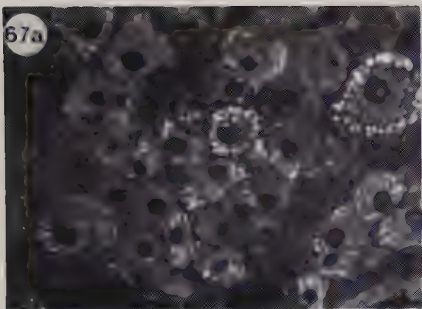
Abb. 67: gefärbt mit Kaninchen anti-Typ II Kollagen Antikörpern.

Abb. 68: gefärbt mit Kaninchen anti-Typ V Kollagen Antikörpern.

Abb. 69: gefärbt mit Kaninchen anti-Fibronektin Antikörpern.

Abb. 70: gefärbt mit Kaninchen anti-Typ I Kollagen Antikörpern.

Abb. 71: gefärbt mit Ziegen anti-Typ III Kollagen Antikörpern.



Virus-infizierte Chondrozyten, gehalten bei 36°C, der permissiven Temperatur, nahmen bipolare, spindelförmige Gestalt an. Die meisten Zellen zeigten weder intra- noch extrazelluläre Fluoreszenz für das knorpelspezifische Typ II Kollagen (Abb. 72); es fluoreszierten dagegen Zellen mit runder Morphologie, die vermutlich nicht-infizierte Chondrozyten darstellten (Abb. 72; markiert durch gebogene Pfeile). Nur wenige Zellen mit bipolarem, transformierten Phänotyp zeigten eine schwache, intrazelluläre Fluoreszenz für Typ II Kollagen (Abb. 72; markiert mit geradem Pfeil).

Typ V Kollagen war in faseriger, extrazellulärer Form deponiert (Abb. 73). Fibronektin bildete individuelle, kurze, extrazelluläre Fasern aus (Abb. 74) - die Intensität der Immunfluoreszenzanfärbung war jedoch gegenüber den bei 41°C gehaltenen Kulturen (vergl. Abb. 69) stark vermindert. Antikörper gegen Typ I Kollagen färbten etwa die Hälfte der bipolaren Zellen schwach intrazellulär an (Abb. 75). Typ III Kollagen wurde in diffuser, intrazellulärer und in faseriger, extrazellulärer Form nachgewiesen (Abb. 76).

Abb. 72-76: Immunfluoreszenz (a)- und Phasenkontrastaufnahmen (b) von Chondrozyten, infiziert mit der temperaturempfindlichen Mutante des Rous Sarcoma Virus; kultiviert für zwei Passagen bei 36°C. Vergr. 560x.

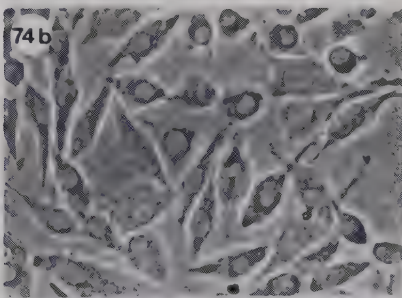
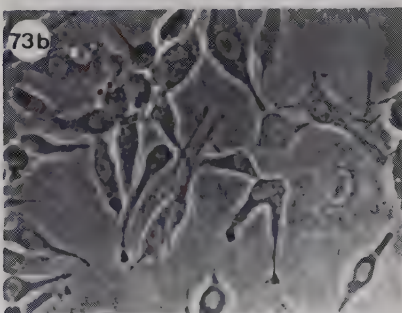
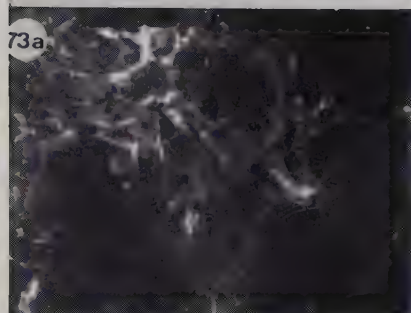
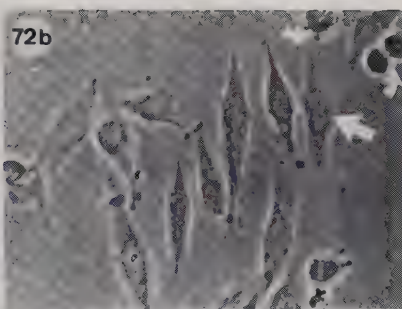
Abb. 72: gefärbt mit Kaninchen anti-Typ II Kollagen Antikörpern.

Abb. 73: gefärbt mit Kaninchen anti-Typ V Kollagen Antikörpern.

Abb. 74: gefärbt mit Kaninchen anti-Fibronektin Antikörpern.

Abb. 75: gefärbt mit Kaninchen anti-Typ I Kollagen Antikörpern.

Abb. 76: gefärbt mit Ziegen anti-Typ III Kollagen Antikörpern.



Diskussion

Fibronektin, das während der Chondrogenese von Mesenchymzellen abgebaut wird (vergl. Abb. 18, 20), ist auch im differenzierten Knorpel *in vivo* nicht mehr nachzuweisen (Linder et al., 1975; Dessau et al., 1980). Hier wurde gezeigt, daß die Chondrozyten nach Freisetzung aus der Knorpelmatrix mittels Enzymbehandlung diese Genfunktion wieder aufnahmen. Die Re-Expression der Fibronektin-synthese erfolgte offensichtlich als Reaktion auf die Entfernung der extrazellulären Matrix. In Puls-Markierungsstudien wurde radioaktives Fibronektin im Kulturmedium von suspendierten Chondrozyten 2 h nach Trypsinieren der Zellen gefunden, während Typ II Prokollagen bereits nach 30 - 60 min nachgewiesen wurde. Nach 20 h in Suspension enthielt das Medium mehr markiertes Fibronektin als Typ II Prokollagen. Das verzögerte Erscheinen von Fibronektin im Kulturmedium geht wahrscheinlich auf eine geringere Anfangssyntheserate zurück.

Die Laktoperoxidase-katalysierte Jodierung identifizierte Fibronektin als das vorherrschende extrazelluläre Protein in Kulturen polygonaler Chondrozyten. Wie bereits diskutiert, erfaßt diese Methode alle "extrazellulären", jodierbaren Proteine, d.h. Matrix- und Zelloberflächenproteine. Die Identität und Funktion eines zweiten, jodierbaren Proteins in Knorpelzellkulturen sind noch unbekannt. Es besitzt in der SDS-Diskelektrophorese ein "scheinbares" Molekulargewicht von 180 000 und ist möglicherweise mit einem von Lowe et al. (1978) beschriebenen, chondrozytenspezifischen Protein identisch.

Die Immunfluoreszenztechnik lokalisierte Fibronectin in Kulturen polygonaler Chondrozyten in Form von kurzen, Zellen verbindenden Strängen; "dedifferenzierte" Zellen zeigten dagegen mit langen Fibronectinfasern ein ähnliches Muster wie authentische Fibroblasten (vergl. Dessau et al., 1978). Neuere Untersuchungen haben auf eine aktive Rolle von Fibronectin während des Vorganges der "Dedifferenzierung" hingewiesen: Chondrozyten, die höheren Dosen exogenen Fibronectins ausgesetzt waren, zeigten morphologische Anzeichen von Dedifferenzierung, später gefolgt von der Beendigung der Synthese des Chondroitinsulfat-Proteoglykans (West et al., 1979; Pennypacker et al., 1979). Die unterschiedliche Einflußnahme verschiedener Chargen des zur Knorpelzellkultur verwendeten fötalen Kälberserums auf Morphologie und Koloniebildung geht daher wahrscheinlich zum Teil auf variierende Fibronectinkonzentrationen zurück.

Die Vorstellung, nach der Fibronectin eine Funktion beim Aufbau und bei der Organisation der extrazellulären Matrix von Knorpelzellen besitzt, wird durch jüngste Befunde gestützt, in denen in frisch angesetzten Monolayerkulturen von Chondrozyten mittels der Immunfluoreszenztechnik zuerst Fibronectin und Chondroitinsulfat-Proteoglykan extrazellulär nachgewiesen wurden (Dessau et al., Manuskript eingereicht). Typ II Kollagen wurde als letzte Komponente in diese vorgebildete Matrix eingelagert, während gleichzeitig Fibronectin, das dann offenbar seine Aufgabe erfüllt hatte, wieder abgebaut wurde.

In Übereinstimmung mit biochemischen Befunden (Rhodes und Miller, 1978) wurde Typ V Kollagen in Kolonien polygonaler Chondrozyten intrazellulär aufgefunden. "Dedifferenzierte" Zellen lagerten es dagegen

in Form langer, extrazellulärer Fasern ab. Es ist noch ungeklärt, welche Rolle Typ V Kollagen bei der Aufrechterhaltung von Struktur und Funktion der Knorpelmatrix besitzt.

Neben den Einflüssen von Zelldichte, Kulturdauer und Serum bewirken eine Reihe von Substanzen, wie z. Bsp. Bromdesoxyuridin (Abbott und Holtzer, 1968; Mayne et al., 1975), Embryoextrakt (Mayne et al., 1976a), konditionierte Medien (Gauss, 1978) und Vitamin A (Hassell et al., 1979) eine "Dedifferenzierung" des Knorpelphänotyps. Diese Arbeit beschäftigte sich nicht mit diesem Irreversiblen Vorgang, den man als "Dedifferenzierung", "Entdifferenzierung" oder "Alterung" bezeichnen kann, sondern nutzte die von Lowe et al. (1978) beschriebene Fähigkeit des Kokarzinogens PMA aus, den Knorpelphänotyp reversibel zu beeinflussen. Für die reversible Veränderung wurde hier der Begriff "Modulation" gewählt und so von der irreversiblen "Dedifferenzierung" abgegrenzt.

Zeitverlaufsstudien demonstrierten die Einflußnahme von PMA auf bereits ausgebildete Knorpelkolonien. Nach Auflösung der Knorpelmatrix wurden die Einzelzellen hierbei zu fibroblastenähnlichen Zellen "moduliert", ohne daß ein Zellteilungszyklus durchlaufen werden mußte. Nach Rückkehr zu Normalbedingungen bildete sich der Knorpelphänotyp nach mehreren Mitosezyklen wieder zurück; es ist fraglich, ob in der Zukunft Kulturbedingungen gefunden werden können, die auch ohne Zellteilung eine Rückbildung ermöglichen.

Neben dem rein morphologischen Effekt führte das Kokarzinogen PMA zu einer Änderung der Genexpression von Chondrozyten. Hierbei beeinflusste es die Synthese von Kollagen in differentieller Weise.

Generell reduzierte es den Anteil der Kollagensynthese an der Gesamtproteinsynthese von etwa 13% auf 3% - ein Befund, der in Einklang mit jüngsten Untersuchungen PMA-behandelter Fibroblastenkulturen (Delclos und Blumberg, 1979) steht. Die Syntheserate pro Zelle des knorpelspezifischen Typ II Kollagens verminderte sich am dritten Tag der PMA-Einwirkung auf nur $\frac{1}{18}$ ihres Ursprungswertes. Der Nachweis einer minimalen Typ II Kollagensynthese unter PMA-Einfluß kann als gesichert gelten: Die Werte lagen deutlich über dem Background des Radioimmunoassays; die Identität der Immunpräzipitate wurde ferner durch SDS-Diskelektrophorese bestätigt. Das von PMA-behandelten Chondrozyten synthetisierte Typ II Kollagen verblieb im Kulturmedium - mit der empfindlichen Immunfluoreszenztechnik ließen sich nach drei Tagen PMA-Einwirkung nur Spuren von Typ II Kollagen in der Zellschicht nachweisen. Insbesondere schloß diese Immunfluoreszenzanalyse aus, daß nach Absetzen von PMA die Rückbildung des Knorpelphänotyps in Form von Typ II Kollagen produzierenden Chondrozyten auf die selektive Vermehrung von wenigen Zellen zurückzuführen war, die durch PMA nicht moduliert wurden.

Der differentielle Effekt von PMA auf die Kollagensynthese drückt sich darin aus, daß - ungeachtet der starken Erniedrigung der Typ II Kollagensyntheserate - sich die Syntheseleistung pro Zelle für Typ I Kollagen fast verdoppelte. Diese Erhöhung könnte eine direkte Folge der PMA-Behandlung sein, oder sich aufgrund einer spontanen, durch die Veränderung der Zellform begünstigten, "Dedifferenzierung" zeigen. Gegen die letztere Erklärung spricht der Befund, daß die modulierten Zellen - obwohl morphologisch und in ihrer Syntheseleistung verändert - nach Subkultivierung in Normalmedium praktisch zu 100% wieder den Knorpelphänotyp exprimieren (Lowe et al., 1978).

Dem Ergebnis, daß Knorpelzellen am 3. Tag der PMA-Behandlung eine minimale Typ II Kollagensynthese aufrechterhalten, steht der Befund gegenüber, daß sie unter den gleichen Bedingungen keine "nachweisbaren" Mengen an Chondroitinsulfat-Proteoglykan synthetisieren (Lowe et al., 1978). Zieht man jedoch das Auflösungsvermögen der biochemischen Proteoglykananalyse in Betracht, so erscheint es denkbar, daß empfindlichere Nachweismethoden wie z. Bsp. Immunpräzipitationstechniken auch hier zur Bestimmung einer geringen Syntheseaktivität führen werden.

Knorpelzellkulturen, 2 Tage mit PMA behandelt, zeigten 5 Tage nach Rückkehr zu Normalbedingungen eine Typ II Kollagensyntheserate, die nur wenig unterhalb der von unbehandelten Kulturen lag. Wirkte PMA für 4 Tage ein, so bildeten sich nach Absetzen von PMA zwar ausgedehnte Knorpelkolonien, der Anteil der Typ II Kollagensynthese war jedoch deutlich niedriger als in unbehandelten Kulturen. Bei noch längeren Einwirkzeiten konnte die Rückbildung des Phänotyps - bedingt durch die zwischenzeitlich erreichte hohe Zelldichte - nicht mehr in Primärkultur untersucht werden. Experimente, in denen Sekundärkulturen in niedriger Zelldichte angesetzt wurden, zeigten, daß sich bei längerer PMA-Behandlung der Anteil der Zellen verminderte, die fähig waren, Knorpelklone in Normalmedium zu bilden (Lowe et al., 1978). Die Chondrozyten gehen hierbei offensichtlich vom reversiblen "modulierten" in den irreversiblen "dedifferenzierten" Zustand über. Biochemisch ist die "Modulation" durch eine starke Suppression der zellspezifischen Typ II Kollagensynthese gekennzeichnet. Die "Dedifferenzierung" bewirkt dagegen ihr vollständiges Abschalten (Müller et al., 1975; Gauss, 1978).

Neben Typ I und Typ II Kollagen wurde nach Pepsinspaltung in PMA-behandelten Zellkulturen - jedoch nicht in Kontrollkulturen - ein hoher Anteil eines niedrig molekularen Materials gefunden, das in der Disk-Elektrophorese als verschmierte Zone wanderte und in der CM-Cellulosechromatographie in der $\beta 1,2$ - Region eluierte. Sein Anteil nahm mit längerer Einwirkungszeit und mit höheren Konzentrationen von PMA zu; er verringerte sich nach Rückkehr zu Normalbedingungen erst langsam. Das Wanderungsverhalten in der SDS-Diskelektrophorese als breite, verschmierte Zone könnte darauf hinweisen, daß es sich hierbei um heterogene, proteolytische Spaltprodukte von Kollagenketten handelt. Diese Erklärung würde mit den Befunden der Zeitverlaufsstudien übereinstimmen, in denen PMA zur Auflösung ganzer Knorpelkolonien in fibroblastenähnliche Einzelzellen führte. Weiterhin wäre sie mit jüngsten Untersuchungen an Endothelzellen in Einklang, in denen nach PMA-Behandlung eine beträchtliche Steigerung der Kollagenase-Aktivität festgestellt wurde (Moscatelli et al., 1980).

Neben der Einwirkung auf die Syntheseraten der Matrixproteine beeinflusste PMA auch deren Verteilung. Typ I, Typ III, Typ V Kollagen und Fibronectin wurden in PMA-behandelten Knorpelzellkulturen in Form langer, extrazellulärer Fasern abgelagert. Diese Verteilung ähnelte damit der von "dedifferenzierten" Chondrozyten; die Intensität der Immunfluoreszenzanfärbung lag jedoch nach PMA-Einwirkung um eine Größenordnung niedriger. Im Gegensatz zum nur vorübergehend nachweisbaren faserförmigen Typ II Kollagen wurden die extrazellulären Stränge von Typ I, Typ III, Typ V Kollagen und Fibronectin bei längerer PMA-Behandlung nicht degradiert, sondern - bedingt durch die zunehmende Zellzahl - dichter.

PMA reduzierte in Knorpelzellkulturen - ähnlich wie in Fibroblastenkulturen (Blumberg et al., 1977) - drastisch die Menge des enzymatisch jodierbaren, extrazellulären Materials. Besonders betroffen hiervon waren Fibronectin und das - vermutlich knorpel-spezifische - 180 K Protein. Dieser Befund kann auf einer Erniedrigung der Fibronectinsyntheserate, auf einer Erhöhung des Fibronectinabbaues oder auf einer veränderten Bindungsfähigkeit des Fibronectins an die Matrix bzw. die Zelloberfläche PMA-behandelter Chondrozyten beruhen. Für eine Beteiligung auch der letzteren Erklärungsmöglichkeit sprechen neuere Untersuchungen an Lungenfibroblasten, in denen die PMA-Behandlung die rasche Abgabe Zellschicht-gebundenen Fibronectins ins Kulturmedium bewirkte (Keski-Oja et al., 1979).

Es ist noch unbekannt, auf welcher Ebene der Phorbolester PMA die Kollagen- und Fibronectinsynthese in Knorpelzellen beeinflusst. Erste Messungen an Fibroblastenkulturen (M. Sobel, pers. Mitteilung) zeigten innerhalb von 2 - 10 h nach Beginn der PMA-Einwirkung eine beträchtliche Erniedrigung an kollagener mRNA an. Sollten sich die Befunde an Chondrozyten bestätigen lassen, so würde dies die schnelle Einflußnahme von PMA auf die Kollagensynthese erklären. Ein weitergehendes Verständnis wird hier jedoch erst möglich sein, wenn Daten über die Synthese- und Degradationsraten der für Typ I bzw. Typ II Kollagen kodierenden mRNA vorliegen.

Die Expression des "src" Genes in Virus-infizierten Knorpelzellkulturen reduzierte den Anteil der Kollagensynthese an der Gesamtproteinsyntheserate um einen Faktor von etwa drei. Dieses Ergebnis

stimmt mit vorangegangenen Untersuchungen an Fibroblastenlinien überein, in denen nach Virustransformation eine Erniedrigung der Kollagensyntheserate festgestellt wurde (Levinson et al., 1975; Kamine und Rubin, 1977). Da die Infektionsrate in Chondrozytenkulturen unter 100% liegt (Pacifici et al., 1977), ist die reale Reduzierung der Kollagensynthese größer - ein beträchtlicher Teil der bei der permissiven Temperatur (36°C) gemessenen Synthese kann auf runde, nicht-infizierte Knorpelzellen zurückgehen.

Es ist noch nicht bekannt, auf welcher Ebene die Expression des "src" Genes die Kollagensynthese von Chondrozyten reguliert. In transformierten Fibroblasten wurde eine erniedrigte Menge an kollagener mRNA gefunden (Howard et al., 1978; Adams et al., 1979; Sandmeyer und Bornstein, 1979).

RSV-ts infizierte Knorpelzellen, kultiviert bei der nicht-permissiven Temperatur (41°C), glichen in Bezug auf Morphologie und Lokalisierung der Kollagentypen und des Fibronektins normalen, nichtinfizierten Zellen. Fibronektin bildete kurze, Zellen verbindende Fasern. Typ I Kollagen wurde nicht gefunden; einzelne Zellgruppen enthielten intrazelluläres Typ III Kollagen. Alle Chondrozyten färbten intrazellulär für das knorpelspezifische Typ II Kollagen und für Typ V Kollagen an.

Die Expression des "src" Genes supprimierte die Synthese von Typ II Kollagen: Die Mehrzahl der bipolaren, transformierten Zellen reagierte nicht mit anti-Typ II Kollagen Antikörpern. Die Tatsache, daß einige Zellen mit transformiertem Phänotyp eine sehr schwache, jedoch deutliche intrazelluläre Fluoreszenz aufwiesen, spricht dafür,

daß die Syntheserate von Typ II Kollagen auf ein sehr niedriges Niveau abgesenkt, jedoch nicht völlig unterdrückt wurde. Im Vergleich zu diesen Befunden kamen Pacifici et al. (1977) zu dem Schluß, daß die Synthese von Chondroitinsulfat-Proteoglykan, dem zweiten knorpelspezifischen Molekül, in transformierten Knorpelzellen nicht mehr "nachweisbar" ist. Jedoch scheint es auch hier denkbar, daß die Anwendung empfindlicherer Nachweismethoden wie z.Bsp. Immunfluoreszenztechniken zur Bestimmung einer geringen Syntheseaktivität führt.

Weiterhin zeigten die RSV-ts infizierten Knorpelzellen, kultiviert bei der permissiven Temperatur, Gemeinsamkeiten mit "dedifferenzierten" Chondrozyten. Hierzu gehörten die extrazelluläre Deponierung von Typ III und Typ V Kollagen und der Nachweis von intrazellulärem Typ I Kollagen in etwa der Hälfte der Zellen. Unterschiede bestanden in der sehr schwachen Immunfluoreszenzanfärbung transformierter Zellen und darin, daß dedifferenzierte Chondrozyten ein dichtes Netz extrazellulärer Fasern von Typ I Kollagen und Fibronektin ablagerten; dieses fehlte in Kulturen RSV-ts transformierter Zellen.

Die biochemische Untersuchung des Kollagens aus der Zellschicht RSV-ts infizierter Chondrozyten ergab bei der permissiven und der nicht-permissiven Temperatur einen Hauptanteil von Typ II Kollagen neben Typ V Kollagen. Da die Infektionsrate der Knorpelzellen unter 100% lag, war der größte Teil des bei der permissiven Temperatur (36°C) synthetisierten Typ II Kollagens vermutlich auf runde, nicht-infizierte Chondrozyten zurückzuführen.

Die biochemische Untersuchung des Kollagens im Kulturmedium identifizierte überraschenderweise eine Kollagenkette, die in der CM-Cellulosechromatographie bei geringerer Ionenstärke eluierte als die $\alpha 1(II)$ - bzw. $\alpha 1(I)$ -Kette, und die in der SDS-Diskelektrophorese eine

niedrigere Wanderungsgeschwindigkeit aufwies. Eine Erklärungsmöglichkeit läge in der Annahme einer neuen genetischen Variante des Knorpelkollagens; zum anderen könnte hierbei auch eine $\alpha 1(II)$ -Kette mit erhöhtem Hydroxylierungs- oder Glykosylierungsgrad vorliegen. Für die letztere Interpretation sprechen vorläufige Ergebnisse von Disk-Elektrophoresen der BrCN-Spaltprodukte: Das BrCN-Peptidmuster jener Kette ähnelte dabei bei etwas verlangsamer Wanderungsgeschwindigkeit dem der $\alpha 1(II)$ -Kette. In diesem Zusammenhang ist eine kürzliche Untersuchung von Burgeson und Hollister (1979) interessant, in der die Isolierung von drei neuen Kollagenketten aus menschlichen Knorpel beschrieben wurde. Eine davon, die sogenannte "3 α "-Kette weist im Hinblick auf Mobilität in der SDS-Diskelektrophorese und in Bezug auf die Ähnlichkeit ihres BrCN-Peptidmusters mit dem der $\alpha 1(II)$ -Kette Gemeinsamkeiten mit der hier nachgewiesenen Kollagenkette auf.

Fibronektin, das in Kulturen RSV-ts infizierter Chondrozyten bei 41°C dicke, Zellen verbindende Stränge bildete, wurde nach dem Transferieren der Kulturen auf 36°C in Form individueller, nur schwach anfärbender Fasern nachgewiesen. Es stellt sich die Frage, auf welche Weise hierbei das bei der nicht-permissiven Temperatur deponierte Fibronektinnetz abgebaut und umstrukturiert wurde. Eine Erklärungsmöglichkeit bietet die Beobachtung, daß transformierte Zellen größere Mengen der Protease Plasminogen-Aktivator ausschütten (Reich, 1975). Diese überführt das im Serum vorkommende Zymogen Plasminogen in das aktive Enzym. Plasmin vermag dann das Protease-empfindliche Fibronektin von der Zelloberfläche bzw. der Matrix abzuspalten (Blumberg und Robbins, 1975).

Zusammenfassung

Chondrozyten reexprimieren nach Freisetzen aus der Knorpelmatrix die Fibronektinsynthese. In Kulturen polygonaler Knorpelzellen ist Fibronektin das vorherrschende jodierbare, extrazelluläre Protein.

Der Vorgang der "Dedifferenzierung" führt neben der Umschaltung von Typ II auf Typ I Kollagensynthese zu einer völligen Umstrukturierung der Matrix: Typ I, Typ III, Typ V Kollagen und Fibronektin bilden in dedifferenzierten Kulturen ein Netzwerk von langen, extrazellulären Fasern aus.

Das Kokarzinogen PMA "moduliert" die Genexpression von Chondrozyten. Neben dem Einfluß auf die Zellmorphologie bewirkt es eine starke Reduzierung, jedoch nicht eine völlige Unterdrückung der Synthese des knorpelspezifischen Typ II Kollagens. Die Typ I Kollagensyntheserate wird dabei erhöht.

Die Zellschicht PMA-behandelter Chondrozyten enthält nur Spuren von extrazellulärem, jodierbarem Fibronektin.

Die Matrixproteine Typ I, Typ III, Typ V Kollagen und Fibronektin sind in Form langer Fasern abgelagert. Diese Verteilung gleicht der von dedifferenzierten Knorpelzellkulturen; jedoch ist die Intensität der Immunfluoreszenzanfärbung PMA-behandelter Kulturen wesentlich geringer.

Virustransformation hat auf die Genexpression von Knorpelzellen ähnliche Auswirkungen wie PMA-Behandlung. Die Expression des "src" Genes erniedrigt den Anteil der Kollagensynthese an der Gesamtprotein-syntheserate. Die Synthese des knorpelspezifischen Typ II Kollagens wird stark reduziert, jedoch nicht völlig unterdrückt.

Polygonale Knorpelzellen, kultiviert bei der nicht-permissiven Temperatur (41°C) sind mittels der Immunfluoreszenztechnik nicht von normalen Chondrozyten zu unterscheiden: Typ II und Typ V Kollagen werden intrazellulär nachgewiesen; Fibronektin bildet die für Knorpelzellen typischen kurzen, Zellen verbindenden Stränge.

Transformierte Chondrozyten, kultiviert bei der permissiven Temperatur (36°C) zeigen nur selten eine schwache, intrazelluläre Fluoreszenz für Typ II Kollagen - dagegen färben runde, nicht-infizierte Knorpelzellen kräftig an. Das Vorkommen von Fibronektin ist stark vermindert; es bildet zumeist individuelle, kurze Fasern aus.

B) DAS EXTRAZELLULÄRE PROTEINMUSTER VON MUSKELZELLEN

1. Veränderungen des extrazellulären Proteinmusters während der Muskeldifferenzierung.

Einführung

Bindegewebe ist ein integraler Bestandteil des Skelettmuskels. Retikuläre Bindegewebsfasern umhüllen individuelle Muskelschläuche und bündeln sie zu größeren anatomischen Einheiten.

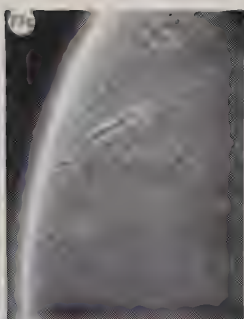
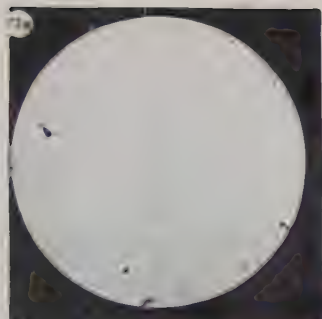
Neben diesen strukturellen Aufgaben kommt der extrazellulären Matrix der Bindegewebszellen eine Funktion während der Muskeldifferenzierung zu. Untersuchungen zur Myogenese in vitro zeigten die Abhängigkeit des normalen Differenzierungsverlaufes von der Kollagen- (Hauschka und Königsberg, 1966) bzw. der Fibronektin-Beschichtung (Chiquet et al., 1978) der Gewebekulturschalen.

Die Synthese der kollagenen Matrix im Skelettmuskel wurde generell fibroblastenartigen Zellen zugeschrieben, die in genügender Anzahl im Muskelgewebe vorhanden sind. Jüngere Untersuchungen wiesen jedoch nach, daß Muskelzellen auch selbst Kollagen produzieren können (Lipton, 1977b). Kulturen von Hühnerbrustmuskelzellen synthetisierten dabei Typ I Kollagen (Mayne und Strahs, 1974; Ketley et al., 1977). Bailey et al. (1979) fanden zusätzlich Hinweise auf die Synthese von Typ III und Typ V Kollagen.

Die Kollagentypanalyse in Kulturen von Hühnerbrustmuskelzellen wird durch die Schwierigkeit erschwert bzw. in Frage gestellt, reine, Fibroblasten-freie Zellkulturen zu erhalten. Selbst Selektionsmethoden unter Ausnützung unterschiedlicher Anhaftgeschwindigkeiten

(Yaffe, 1969) und Behandlungen mit Cytochalasin B (Sanger, 1978; Turner, 1978) oder Cytosin-Arabinosid (Yeoh und Holtzer, 1977) ergaben keine zu 100% Fibroblasten-freie Kulturen.

Im Gegensatz zum Hühnermuskel lieferte die Dissoziation des Brustmuskels der japanischen Wachtel eine Zellsuspension, die - kultiviert in klonaler Dichte - ausschließlich Muskelklone hervorbrachte. Kontaminierende Fibroblasten waren extrem selten; ihr Wachstum war zudem stark behindert (Konigsberg, 1971; Lipton 1977a,b). Die nachfolgenden Untersuchungen bedienen sich dieses vorteilhaften Zellkultursystems zur Beantwortung der Frage, welche Kollagentypen von Muskelzellkulturen synthetisiert werden. Ferner soll geklärt werden, ob es während der Differenzierung von einkernigen Myoblasten zu vielkernigen Muskelschläuchen zu einer Änderung der Genexpression der Matrixproteine kommt. Weiterhin soll die Myogenese durch PMA (Cohen et al., 1977) bzw. durch Virustransformation (Holtzer et al., 1975) "gestört" und der Einfluß auf die Expression der Kollagentypen und von Fibronektin untersucht werden.



Leichter in der Handhabung als Einzelklone zeigten sich "Massenklonkulturen", in denen eine Vielzahl von - jedoch noch unterscheidbaren - Muskelkolonien heranwuchs (Abb. 81). Nach einer gewissen Kulturdauer wurde hier das normale Kulturmedium durch ein "Mangelmedium" ersetzt, um die Fusion einzuleiten und eine übermäßige Proliferation der einkernigen Myoblasten zu unterbinden (Devlin und Emerson, 1978).

In diesen Massenklonkulturen ließ sich leicht nachprüfen, daß alle wohl ausgebildeten Kolonien differenzierte Muskelschläuche enthielten, d.h. Muskelklone waren (vergl. Abb. 81c). In seltenen Fällen (2-3 Klone je 10 Massenklonplatten) ließen sich kleine Kolonien von pigmentierten (Abb. 82a,b)- oder "mesenchymalen" Zellen (Abb. 82c) beobachten. Ihre Zellzahl blieb jedoch auf etwa 20-40 beschränkt.

Während sich die Massenklonkulturen besonders gut für Immunfluoreszenzuntersuchungen eigneten, lieferten Massenkulturen - besonders während der ersten Tage in Kultur - genügend Material für die biochemische Analyse. Wachtelmyoblasten zeigten in Massenkultur ein sehr schnelles Zellwachstum und ein reproduzierbares Differenzierungsverhalten. Während nach 48 h in Kultur fast ausschließlich nur einkernige Myoblasten zu erkennen waren (Abb. 83b), konnte nach weiteren 24 h Kultur in "Mangelmedium" bereits eine beträchtliche Fusionsrate festgestellt werden (Abb. 83c).

Abb. 81: "Massenklonkulturen" von Wachtelmuskelzellen.

Nach der Ausplattierung von $1,2 \times 10^3$ Zellen je 10cm Petrischale wurden die Kulturen am 9. Tag fixiert und mit Giemsa-Lösung angefärbt.

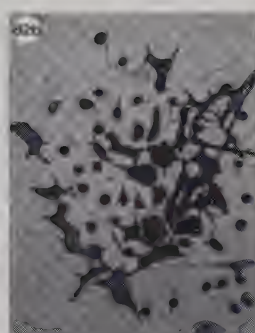
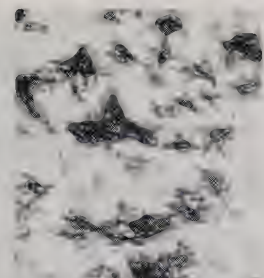
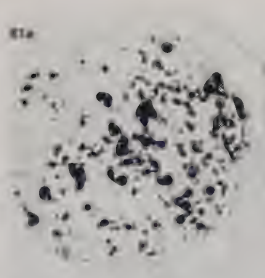
- a) kultiviert in Medium mit 10% Pferdeserum, 5% Embryoextrakt; 3fach verkleinert.
- b) kultiviert für 5 Tage in Medium mit 10% Pferdeserum, 5% Embryoextrakt, anschließend in "Mangelmedium" mit 5% Pferdeserum, 1% Embryoextrakt; 2fach verkleinert.
- c) wie b), jedoch 3fach vergrößert.

Abb. 82: Typen von Nicht-Muskelzellen in Myoblasten-Klonkulturen.

- a) Kolonie pigmentierter Zellen, 60x. b) wie a) 360x vergrößert.
- c) Kolonie von "mesenchymalen" Zellen; Vergr. 300x.

Abb. 83: Wachtelmuskelzellen in Massenkultur. Phasenkontrast, Vergr. 300x. Nach 48 h erfolgte die Kultivierung in "Mangelmedium".

- a) 24 h, b) 48 h, c) 72 h, d) 96 h, e) 120 h in Kultur; f) wie e), jedoch ohne Überführung in "Mangelmedium".



Untersuchung der Kollagensynthese

Zur Untersuchung von Veränderungen der Kollagensynthese während der Muskeldifferenzierung wurden Massenkulturen von Wachtelmyoblasten zu verschiedenen Zeiten in Kultur für jeweils 24 h mit ^3H -Prolin markiert. Nach Pepsinbehandlung wurden die Kollagenketten auf der SDS-Diskelektrophorese aufgetrennt. Das Bandenmuster wurde durch Fluorographie lokalisiert und densitometrisch ausgewertet (Abb. 84).

Abb. 84: Änderung der Kollagensynthese während der Differenzierung von Wachtelmyoblasten. Massenkulturen (5×10^5 Zellen je 10 cm Schale) wurden zu den angegebenen Zeiten für 24 h mit $50 \mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -Prolin markiert. Die Zellen wurden dabei während der ersten 48 h in Kultur in Normalmedium kultiviert, danach mit "Mangelmedium" versorgt, um die Fusion synchronisiert einzuleiten. Am Ende des jeweiligen Markierungszeitraumes wurden Phasenkontrastphotos der Kulturen aufgenommen, um die Fusionsrate zu dokumentieren. Nach Pepsinbehandlung der Zellschicht bzw. des Kulturmediums wurden die Proben durch SDS-Diskelektrophorese auf einem 6% Gel von Polyacrylamid aufgetrennt. Die Bandenmuster wurden durch Fluorographie lokalisiert. Die densitometrische Auswertung zeigt den Bereich der Kollagen α -Ketten.

a-h) Markierungszeitraum (Stunden in Kultur).

a,b) 24 - 48 h; (Foto, aufgenommen nach 48 h; siehe Abb. 83b).

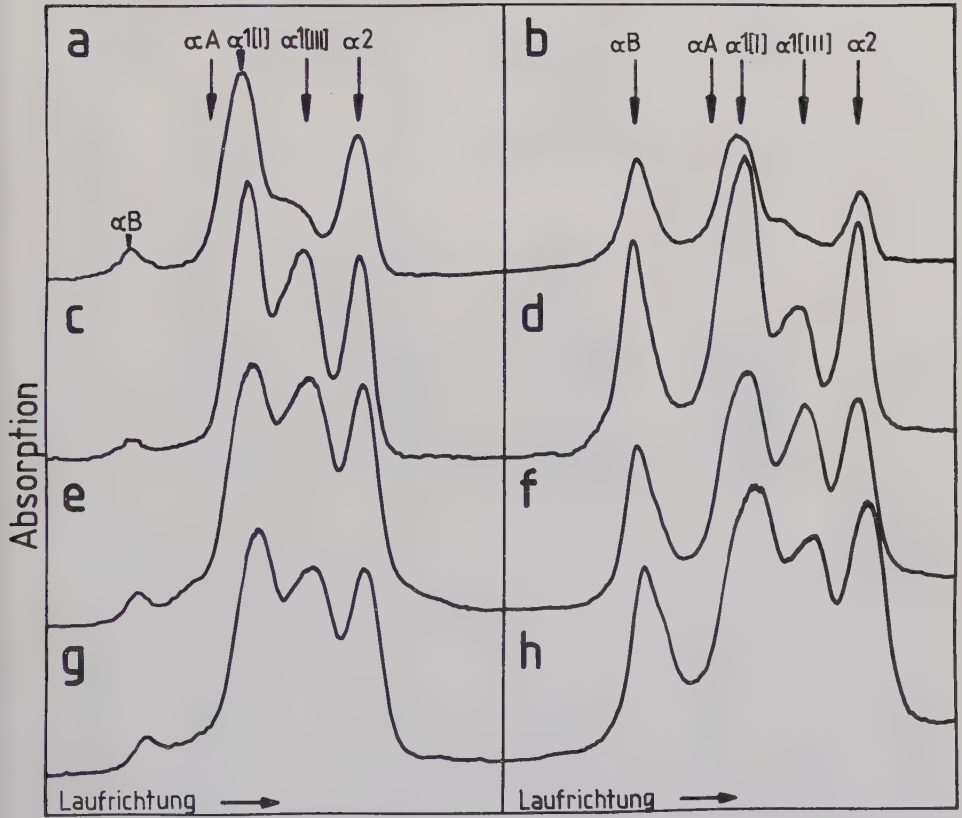
c,d) 48 - 72 h; (Foto, aufgenommen nach 72 h; siehe Abb. 83c).

e,f) 72 - 96 h; (Foto, aufgenommen nach 96 h; siehe Abb. 83d).

g,h) 96 -120 h; (Foto, aufgenommen nach 120 h; siehe Abb. 83e).

MEDIUM

ZELLSCHICHT



Während aller Stadien der Muskelzellkultur war Typ I Kollagen dominierend in der Zellschicht und im Kulturmedium. Es wurde bereits 12 h nach Ausplattieren der Zellen nachgewiesen (nicht gezeigt) und hatte am 2. Tag einen Anteil von 80% am Gesamtkollagen des Mediums und von 55% der Zellschicht. Zu diesem Zeitpunkt waren 3% - 8% des Kollagens im Kulturmedium und etwa 40% in der Zellschicht Typ V Kollagen (Abb. 85a,b).

In jungen Kulturen machte Typ III Kollagen weniger als 10% des Gesamtkollagens aus (Abb. 85a,b). Am dritten Tag stieg seine Synthese dagegen beträchtlich an und erreichte Anteile von etwa 30% im Kulturmedium und von 10% - 15% in der Zellschicht (Abb. 85c-h).

Die Bestimmung des Verhältnisses von ^3H -Hydroxyprolin zu ^3H -Prolin (nicht gezeigt) ergab keine entscheidenden Unterschiede zwischen dem zweiten und fünften Tag in Kultur. Dies zeigt an, daß der Anteil der Kollagensynthese an der Gesamtproteinsynthese, der 6% - 8% betrug, sich durch die Fusion nicht wesentlich änderte.

Abb. 85: Änderung der Kollagensynthese während der Differenzierung von Wachtelmyoblasten - Schematische Darstellung der relativen Anteile der Kollagentypen I, III und V (=AB₂).

Die Werte wurden durch planimetrische Auswertung der Abb. 84 gewonnen und repräsentieren Daten eines typischen Experimentes von drei gleichartigen.

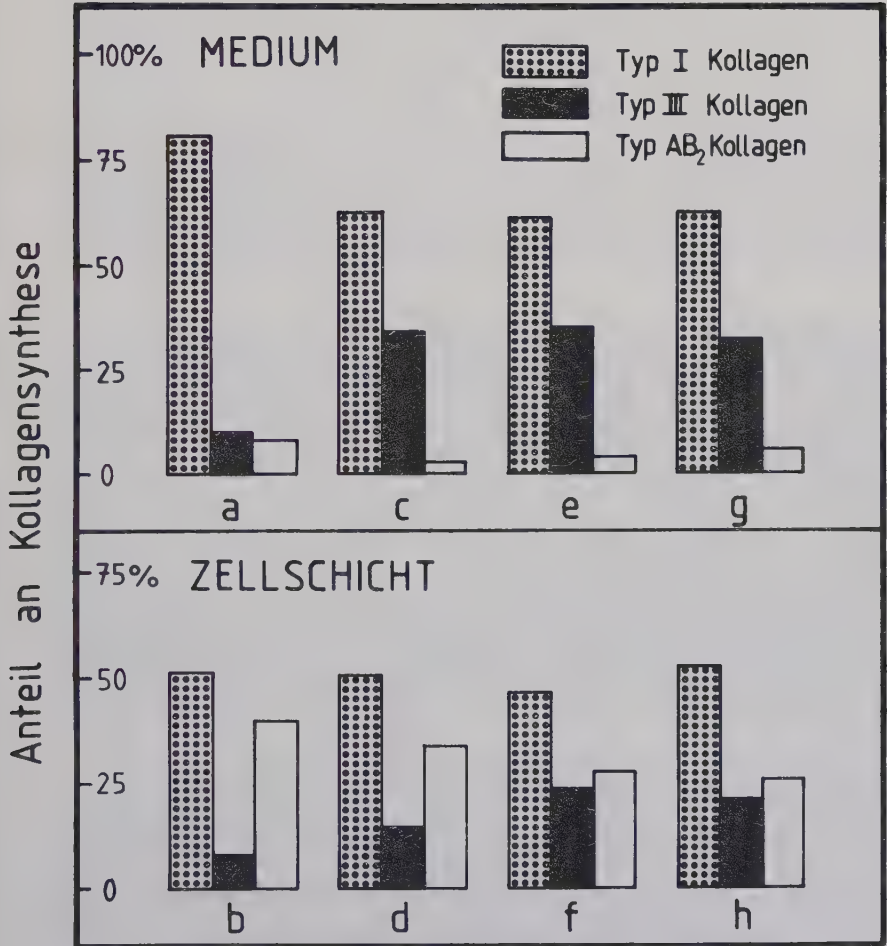
a-h) Markierungszeitraum (Stunden in Kultur).

a,b) 24 - 48 h.

c,d) 48 - 72 h.

e,f) 72 - 96 h.

g,h) 96 - 120 h.



Nach dem Vorliegen der biochemischen Befunde, die keine grundlegende Veränderung des Kollagen-Synthesemusters während der Myogenese ergeben hatten, wurden die Kollagentypen nun mittels der Immunfluoreszenztechnik lokalisiert. Dabei reagierten Antikörper gegen Typ I und Typ III Kollagen intrazellulär mit einkernigen Myoblasten (Abb. 86), jedoch nicht mit differenzierten Muskelschläuchen (Abb. 87a,b). Typ V Kollagen war dagegen in einkernigen Zellen und in Muskelschläuchen nachzuweisen (Abb. 87c). Einkernige Zellen mit eher fibroblastenartiger Morphologie - in Abb. 87a,b zwischen den nicht-anfärbenden Muskelschläuchen lokalisiert - zeigten häufig eine intensivere, intrazelluläre Fluoreszenz mit anti-Typ I oder anti-Typ III Kollagen Antikörpern als spindelförmige Zellen.

Der Beginn der extrazellulären Ablagerung von Kollagen war abhängig von der Zelldichte. Massenkulturen entwickelten während der ersten 3 - 6 Tage ein dichtes Netzwerk von Kollagenfibrillen (Abb. 88); Klonkulturen benötigten hierzu 8 - 10 Tage (nicht gezeigt).

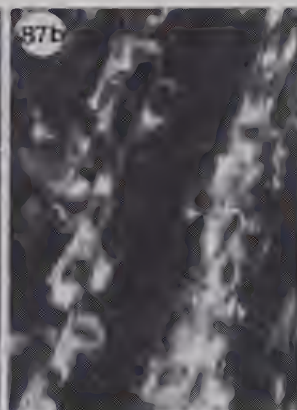
Die Ausbildung einer Basalmembran, die ultrastrukturell erst auf älteren Muskelschläuchen festzustellen war (Lipton, 1977a), konnte mit Antikörpern gegen Laminin - einem Glykoproteinbestandteil von Basalmembranen (Timpl et al. 1979) - auch in früheren Stadien beobachtet werden. Laminin war mit fleckenhafter Verteilung auch auf jüngeren Muskelschläuchen und einkernigen Myoblasten nachzuweisen (Abb. 89).

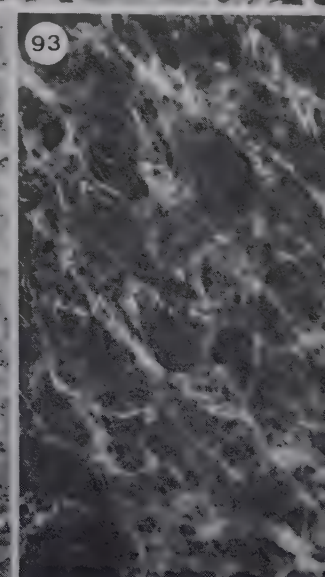
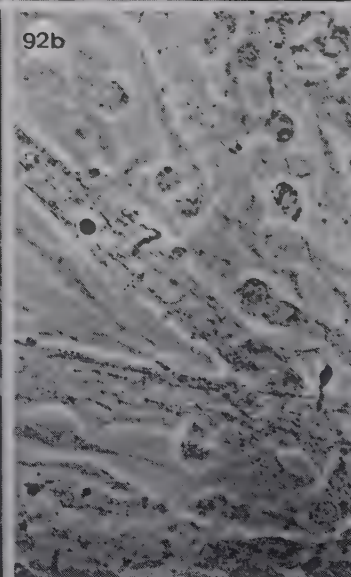
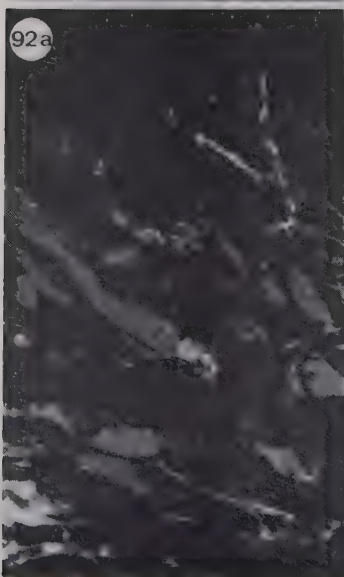
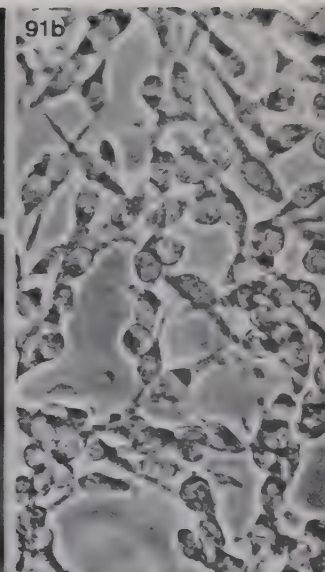
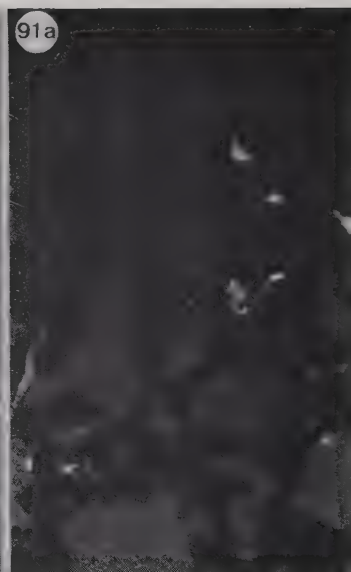
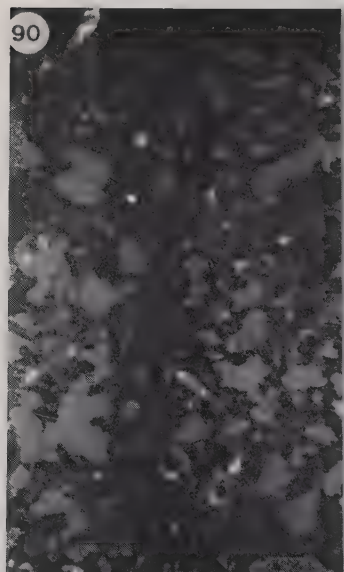
Abb. 86: Immunfluoreszenz-Färbungen eines Klonen von Wachtelmuskelzellen; vier Tage in Kultur; Vergr. 640x.
a,b) gefärbt mit Kaninchen anti-Typ I Kollagen Antikörpern.
c) gefärbt mit Ziegen anti-Typ III Kollagen Antikörpern.

Abb. 87: Immunfluoreszenz-Färbung eines Klonen von Wachtelmuskelzellen; sechs Tage in Kultur; Vergr. 860x.
a) gefärbt mit Kaninchen anti-Typ I Kollagen Antikörpern.
b) gefärbt mit Ziegen anti-Typ III Kollagen Antikörpern.
c) gefärbt mit Kaninchen anti-Typ V Kollagen Antikörpern.

Abb. 88: Immunfluoreszenz-Färbung eines Muskelzellklones; 10 Tage in Kultur; gefärbt mit Kaninchen anti-Typ I Kollagen Antikörpern. Vergr. 640x.

Abb. 89: Immunfluoreszenz (a) und Phasenkontrastaufnahme (b) eines Muskelzellklones, 6 Tage in Kultur, gefärbt mit Kaninchen anti-Laminin Antikörpern.





Fibronektin ließ sich intrazellulär in etwa 10-15% der einkernigen, bipolaren Zellen von 3 Tage alten Muskelklonen lokalisieren (Abb. 90,91). In älteren Kulturen wurde es zunehmend extrazellulär abgelagert (Abb.92); Muskelschläuche färbten dabei nicht an. Nach 10 Tagen in Kultur hatte sich ein dichtes, sehr feines Fibronektin-Netzwerk gebildet (Abb. 93).

Abb. 90 - 93: Immunfluoreszenz (a)- und Phasenkontrastaufnahmen (b) von Klonen von Wachtelmuskelzellen; gefärbt mit Kaninchen anti-Fibronektin Antikörpern. Gleichförmig anfärbende Flächen sind freie, nicht von Zellen bedeckte Stellen. Der mit denaturiertem Hühner-Typ I Kollagen beschichtete Boden der Zellkulturschale bindet Fibronektin aus dem Pferdeserum und reagiert daher gleichmäßig positiv mit anti-Fibronektin Antikörpern. Anhaftende und wandernde Myoblasten entfernen dieses Substrat (schwarze Flächen in der Immunfluoreszenz).

Abb. 90: 3 Tage alter Klon; Vergr. 280x.

Abb. 91: wie Abb. 90, jedoch 720x vergrößert.

Abb. 92: 6 Tage alter Klon; Vergr. 720x.

Abb. 93: 10 Tage alter Klon; Vergr. 1040x.

II. Der Einfluß eines Kokarzinogens auf die Muskeldifferenzierung.

In einer früheren Untersuchung demonstrierten Cohen et al. (1977) die Fähigkeit von PMA, die Differenzierung von Hühnermuskelnzellen *in vitro* reversibel zu hemmen. Dieser Befund bestätigte sich an Kulturen von Wachtelmuskelzellen (Abb. 94, 95). PMA-behandelte Myoblasten nahmen fibroblastenartige Morphologie an (Abb. 95a) und erreichten sehr hohe Zelldichten bei völliger Unterdrückung der Fusion (95b). Mitbedingt durch den Verlust der Kontaktinhibition türmten sich die Zellen zu Aggregaten aufeinander (Abb. 95c) – ein Verhalten, das dem transformierter Zellen ähnelte. Nach Überführen in Normalmedium fusionierten die PMA-behandelten Myoblasten wieder zu Muskelschläuchen (Abb. 95d).

Im Gegensatz zu normalen Muskelzellkulturen zeigten PMA-behandelte Wachtelmyoblasten keine intrazelluläre Fluoreszenz für Typ I Kollagen (Abb. 96), Typ III Kollagen, Typ V Kollagen und Fibronektin (nicht gezeigt). Auch extrazellulär konnten nur minimale Spuren der Matrixproteine nachgewiesen werden.

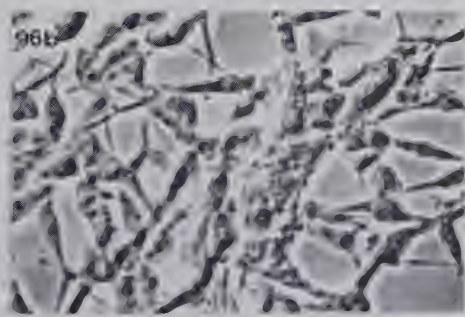
Abb. 94-95: Der Einfluß von PMA auf die Differenzierung von Wachtelmuskelzellen.

Phasenkontrastaufnahmen; Vergr. 420x.

Abb. 94: Kontrolle: Myoblasten in Normalmedium nach 2 Tagen (a) und nach 4 Tagen (b) in Kultur.

Abb. 95: Myoblasten, kultiviert in Medium mit $5 \times 10^{-8} \text{M}$ PMA, nach 2 Tagen (a), nach 4 Tagen (b) und nach 6 Tagen (c) in Kultur; d) Myoblasten, kultiviert für 4 Tage in Medium mit PMA, dann für weitere 2 Tage in Normalmedium.

Abb. 96: Immunfluoreszenz (a)-und Phasenkontrastaufnahme (b) von PMA-behandelten Wachtelmyoblasten; Vergr. 740x; gefärbt mit Kaninchen anti-Typ I Kollagen Antikörpern. Massenkulturen von Wachtelmuskelzellen wurden in Medium mit $5 \times 10^{-8} \text{M}$ PMA für drei Tage kultiviert.



III. Der Einfluß von Virustransformation auf die Muskeldifferenzierung.

Eine Reihe früherer Arbeiten bediente sich temperaturempfindlicher Virusmutanten zur Untersuchung des Einflusses der Expression des "src"-Genes auf die Muskeldifferenzierung (Holtzer et al., 1975; Fiszman und Fuchs, 1975; Hynes et al., 1976). Infizierte Myoblasten, kultiviert bei der permissiven Temperatur (36°C), verharnten dabei im Zellteilungszyklus; die Muskeldifferenzierung war blockiert. Erst nach Überführen der Kulturen auf die nicht-permissive Temperatur (41°C) wurde die Fusion eingeleitet. Dieses Kultursystem sollte hier zur Untersuchung von Veränderungen der Matrixproteine herangezogen werden.

Muskelzellen, gehalten bei der permissiven Temperatur, zeigten mit Antikörpern gegen die Matrixproteine eine diffuse, intrazelluläre Fluoreszenz (Abb. 97,98). Nur wenige Zellen färbten intensiv an; diese besaßen bipolare Morphologie (vergl. Abb. 97a,b) und stellten vermutlich nicht-infizierte Myoblasten dar.

Bereits 20 h nach Überführen der Kulturen auf die nicht-permissive Temperatur (41°C) war eine starke Änderung der Zellmorphologie festzustellen. Alle einkernigen Myoblasten reagierten deutlich intrazellulär mit den Antikörpern gegen die Matrixproteine (Abb. 99).

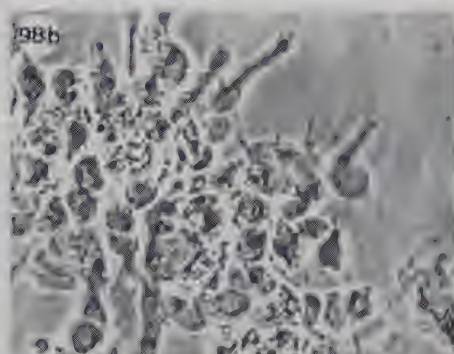
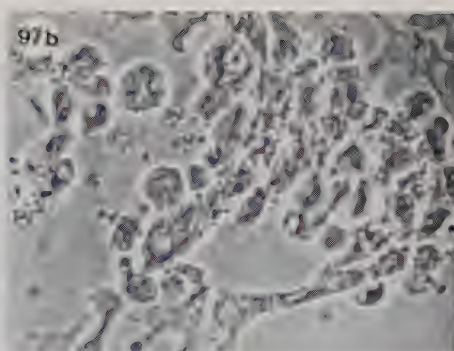
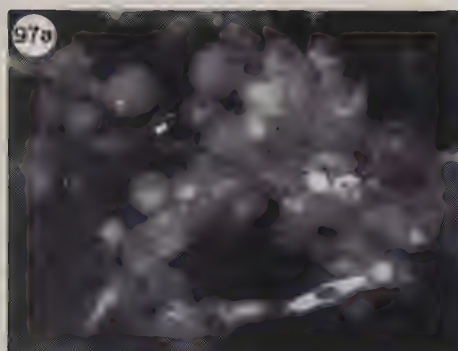
Abb. 97-100: Immunfluoreszenz (a)- und Phasenkontrastaufnahmen (b) von RSV-ts infizierten Hühnermuskelzellen. Vergr. 720x.

Abb.97,98: kultiviert für zwei Passagen bei der permissiven Temperatur (36°C).

Abb. 97: gefärbt mit Kaninchen anti-Typ I Kollagen Antikörpern.

Abb. 98: gefärbt mit Kaninchen anti-Fibronektin Antikörpern. Antikörper gegen Typ III und Typ V Kollagen färbten ebenfalls diffus, intrazellulär an (nicht gezeigt).

Abb.99,100: kultiviert für zwei Passagen bei der permissiven Temperatur, überführt 20 h (Abb. 99) bzw. 2 Tage (Abb. 100) vor dem Fixieren auf die nicht-permissive Temperatur (41°C); gefärbt mit anti-Typ I Kollagen Antikörpern.



Nach zwei Tagen Kultur bei 41°C färbten einkernige Muskelzellen intensiv intrazellulär an (Abb. 100,101,102). Differenzierte Muskelschläuche reagierten dagegen nur mit anti-Typ V Kollagen Antikörpern.

Mit zunehmender Kulturdauer wurden Typ I Kollagen (Abb. 103), Typ III Kollagen (nicht gezeigt) und Fibronektin (Abb. 104) in Form eines dichten extrazellulären Netzwerkes abgelagert.

Abb. 101-104: Immunfluoreszenz (a)- und Phasenkontrastaufnahmen (b) von RSV-ts infizierten Hühnermuskelzellen. Vergr. 720x. Die Kulturen wurden für zwei Passagen bei der permissiven Temperatur (36°C) gehalten und 2 Tage (Abb. 101,102) bzw. 6 Tage (Abb. 103, 104) vor dem Fixieren auf die nicht-permissive Temperatur (41°C) angehoben.

Abb.101,102: kultiviert für zwei Tage bei 41°C;

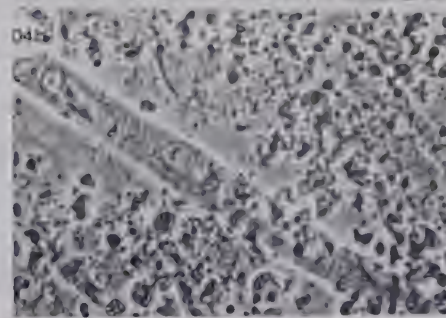
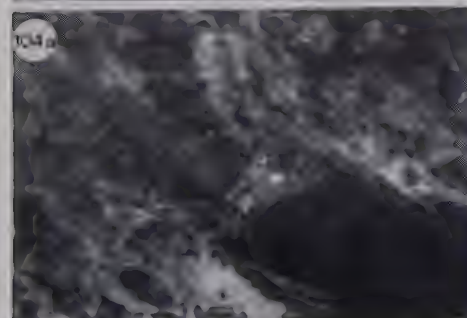
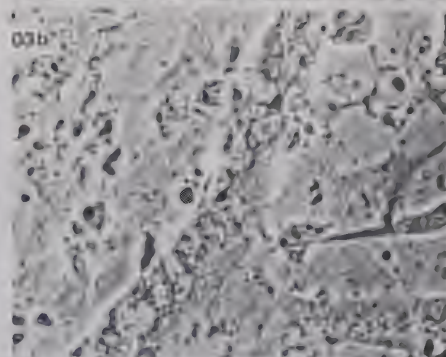
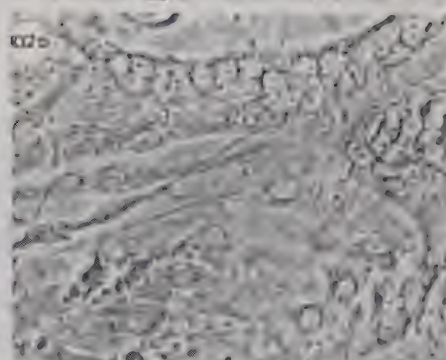
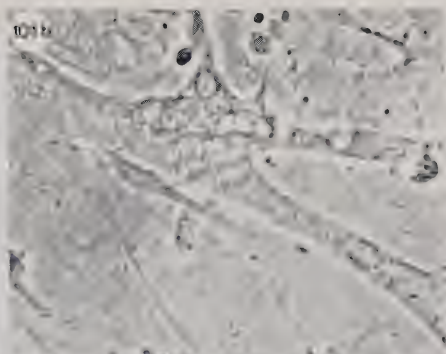
Abb. 101: gefärbt mit Ziegen anti-Typ III Kollagen Antikörpern.

Abb. 102: gefärbt mit Kaninchen anti-Typ V Kollagen Antikörpern.

Abb.103,104: kultiviert für sechs Tage bei 41°C.

Abb. 103: gefärbt mit Kaninchen anti-Typ I Kollagen Antikörpern.

Abb. 104: gefärbt mit Kaninchen anti-Fibronektin Antikörpern.



Diskussion

Bisherige Untersuchungen zur Kollagensynthese in Muskelzellkulturen (Mayne und Strahs, 1974; Ketley et al., 1977; Bailey et al., 1979) wurden durch die Schwierigkeit in Frage gestellt, Fibroblasten-freie Zellkulturen zu erhalten. Deshalb wurden in diesen Experimenten das System der Wachtel-Brustmuskelzellkultur eingesetzt (Königsberg, 1971). Die Prüfung der Differenzierungskapazität von Wachtel-Myoblasten bestätigte die Befunde von Lipton (1977a): Es wurden ausschließlich wohl ausgebildete Muskelklone erhalten. Auf Massenklonplatten traten daneben noch sehr selten verkümmerte Kolonien pigmentierter oder "mesenchymaler" Zellen auf. Das Verhältnis von Muskelzellen zu Nicht-Muskelzellen war jedoch auch in diesen Kulturen höher als 10^5 zu 1 und damit groß genug, um die biochemischen Bestimmungen nicht zu verfälschen.

Die Wachtelmyoblasten zeichneten sich durch ihre bipolare, spindelförmige Gestalt aus. Daneben fanden sich vorwiegend in älteren Klon- oder Massenkulturen einige Zellen mit eher fibroblastenartiger Morphologie. Diese Zellen, die Lipton als "mesenchymal" bezeichnet, besitzen auf der ultrastrukturellen Ebene sowohl Eigenschaften von Myoblasten als auch von "echten" Fibroblasten (Lipton, 1977a). Ihre Stellung im Differenzierungsablauf ist noch ungeklärt. Zum einen könnten sie durch "Dedifferenzierung" bzw. "Entdifferenzierung" aus Myoblasten hervorgehen. In diese Richtung weisen Untersuchungen von Abbott et al. (1974) nach denen die Subkultivierung von Muskelklonen auch einen Anteil an Fibroblastenklonen ergibt. Nach einer anderen Erklärung sind es Zellen, die zeitweise ihre Zellform verändert haben,

ohne dabei ihr Differenzierungspotential zu verlieren. Diese Interpretation wird von Zeitverlaufsstudien gestützt nach denen Wachtelmyoblasten zwischenzeitlich fibroblastenähnliche Morphologie annehmen, danach aber zur bipolaren Form zurückkehren können (Königsberg, pers. Mitteilung).

Die biochemischen Untersuchungen demonstrierten die Synthese von Typ I, Typ III und Typ V Kollagen in Kulturen von Wachtelmuskelzellen. Die drei Kollagentypen wurden in Kulturen unterschiedlichster Differenzierungsstadien nachgewiesen; größere Mengen an Typ III Kollagen wurde allerdings erst ab dem dritten Tag in Kultur synthetisiert. Die Immunfluoreszenztechnik zeigte, daß die Muskeldifferenzierung von einer Änderung der Genexpression der Matrixproteine begleitet wurde: In einkernigen Myoblasten wurden Typ I, Typ III und Typ V Kollagen, in vielkernigen Muskelschläuchen dagegen nur noch Typ V Kollagen nachgewiesen.

Die hier beschriebenen, im vorteilhaften Wachtelzellkultursystem erhaltenen Befunde korrigieren frühere Untersuchungen, in denen vermutlich kontaminierende Hühnerfibroblasten das Ergebnis verfälschten. So fanden Mayne und Strahs (1974) in zu 90% fusionierten Kulturen ausschließlich Typ I Kollagen; nach ihrer Interpretation waren die Muskelschläuche die Quelle hierfür. In einer weiteren Untersuchung (Bailey et al., 1979) wurde Typ I und Typ III Kollagen erst in älteren Kulturen nachgewiesen.

Neben den hier beschriebenen Kollagentypen tritt im Skelettmuskel das Basalmembrankollagen Typ IV auf. In vivo wurde es mittels der Immunfluoreszenztechnik im Endomysium, das individuelle Muskelfasern umschließt, gefunden (Krieg et al., 1979). In ersten Experimenten wurde die Synthese von Typ IV Kollagen auch in Kulturen von Mäusemuskelzellen nachgewiesen (Kühl, pers. Mitteilung).

Die Bedeutung des Anstieges der Typ III Kollagensyntheserate am dritten Tag in Kultur ist unklar, da die Immunfluoreszenzbefunde gegen eine Typ III Kollagensynthese in Muskelschläuchen sprechen. Zu einem gewissen Teil könnte diese Steigerung auf die Zunahme von Zellen mit fibroblastenartiger Morphologie zurückgehen, die auch in der Immunfluoreszenz intensiver mit Antikörpern gegen Typ I und Typ III Kollagen reagierten als spindelförmige Myoblasten. Wahrscheinlicher ist jedoch die Erklärung, daß einkernige Muskelzellen, die auch in differenzierten Kulturen einen Anteil von 10-30% stellen, ähnlich wie Chondrozyten (Benya et al., 1977, 1978; Müller et al., 1977), Corneafibroblasten (Conrad et al., 1980) und Sehnenfibroblasten (Herman et al., 1980) unter in vitro Bedingungen mit zunehmender Kulturdauer die Typ III Kollagensyntheserate steigern.

Auch die Expression von Fibronektin wurde von der Muskel-differenzierung betroffen: Es wurde in Klonen von Wachtelmyoblasten in etwa 10-15% aller Zellen gefunden und bildete später ein sehr dichtes, extrazelluläres Netzwerk aus; vielkernige Muskelschläuche färbten dagegen nicht an. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Untersuchungen an Rattenmuskelzellen (Chen, 1977; Furcht et al., 1978). Zudem zeigte der intrazelluläre Nachweis von Fibronektin in spindelförmigen Myoblasten, daß einkernige Muskelzellen selbst Fibronektin synthetisieren - ein Befund, der bisher angezweifelt wurde (Chiquet et al., 1978).

Obwohl Muskelzellen Matrixproteine synthetisieren und später extrazellulär ablagern, haben diese für den Prozess der Differenzierung anscheinend keine Bedeutung: Eine beträchtliche Fusionsrate ist bereits erreicht, noch bevor Kollagen und Fibronektin in nennenswertem Umfang extrazellulär deponiert werden.

Dagegen besitzen die Matrixproteine Bedeutung als Substrat für das Anhaften und Ausbreiten der Muskelzellen. Das Wachstum der Myoblasten hängt daher *in vitro* von der Beschichtung der Gewebekulturschalen mit nativem oder denaturiertem Kollagen ab (Hauschka und Königsberg, 1966). Dieser permissive Effekt ist unspezifisch, da er von den Kollagentypen I, II, III und IV in etwa gleicher Weise ausgeübt wird (Ketley et al., 1977).

In neueren Untersuchungen konnten Chiquet et al. (1979) Anhaften und Wachstum von Muskelzellen auch auf Fibronektin-beschichteten Gewebekulturschalen beobachten. Hiernach erscheint es wahrscheinlich, daß Fibronektin die Schlüsselrolle beim Anhaften der Myoblasten zukommt; Kollagen-beschichtete Platten bewirken dies indirekt, indem sie Fibronektin aus dem Pferdeserum aufnehmen. Dagegen übt exogenes Fibronektin im Kulturmedium keinen (Puri et al., 1979) bzw. einen eher hemmenden Einfluß auf die Fusion selbst aus (Yamada et al., 1979).

Lipton (1977b) beschrieb in ultrastrukturellen Untersuchungen an der Oberfläche junger Muskelschläuche ein fleckenhaft verteiltes, extrazelluläres Material, in dem er Ansätze einer Basalmembran vermutete; In älteren Kulturen beobachtete er eine wohl ausgebildete Basalmembran. Anfärbungen jüngerer Wachtelmuskelkulturen mit Antikörpern gegen das Basalmembran-Glykoprotein "Laminin" (Timpl et al., 1979) lokalisierten

es hier in fleckenhafter Verteilung nicht nur auf Muskelschläuchen, sondern auch in Bereichen mit einkernigen Zellen. Dieser Befund läßt hoffen, mit diesem Antikörper Vorstufen der Basalmembranbildung erfassen zu können. Dies wäre ein methodischer Vorteil, da einkernige Zellen elektronenoptisch noch keine Spur einer Basalmembran aufweisen (Lipton, 1977b).

Das Kokarzinogen PMA beeinflusste die Genexpression von Muskelzellen in ähnlicher Weise wie die von Knorpelzellen. Es blockierte die Differenzierung reversibel - in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (Cohen et al., 1977). Bei reduzierten Syntheseraten (nicht gezeigt) unterdrückte PMA die extrazelluläre Ablagerung der Matrixproteine.

Das Differenzierungsprogramm Virus-infizierter Muskelzellen ließ sich durch die Expression des "src" Genes reversibel verändern (Holtzer et al., 1975; Fiszman und Fuchs, 1975; Hynes et al., 1976). Es wurde hier gezeigt, daß hiervon auch die Expression der Matrixproteine betroffen war. Bei der permissiven Temperatur (36°C) konnte nur eine sehr schwache, diffuse intrazelluläre Fluoreszenz für die Matrixproteine beobachtet werden. Nach Überführen der Kulturen auf die nicht-permissive Temperatur (41°C) wurde die Muskeldifferenzierung eingeleitet und das normale Muster der Matrixproteine exprimiert: Einkernige Myoblasten färbten mit anti-Typ I, Typ III, Typ V Kollagen und Fibronektin Antikörpern, vielkernige Muskelschläuche dagegen nur noch mit anti-Typ V Kollagen Antikörpern.

Zusammenfassung

Einkernige Myoblasten synthetisieren Typ I, Typ III und Typ V Kollagen.

Die Muskeldifferenzierung bewirkt eine Änderung der Genexpression der Matrixproteine: Einkernige Myoblasten reagieren mit Antikörpern gegen Typ I, Typ III, Typ V Kollagen und Fibronectin, vielkernige Muskelschläuche dagegen nur noch mit anti-Typ V Kollagen Antikörpern.

Das Kokarzinogen PMA blockiert die Muskeldifferenzierung und die extrazelluläre Ablagerung der Matrixproteine.

Die Expression des "src"-Genes in Kulturen Virus-infizierter Myoblasten unterdrückt die Muskeldifferenzierung; die Matrixproteine lassen sich nur schwach intrazellulär nachweisen.

Die Überführung der Kulturen auf die nicht-permissive Temperatur initiiert das normale Differenzierungsprogramm; das Muster der Matrixproteine von einkernigen Myoblasten und vielkernigen Muskelschläuchen gleicht jetzt dem nicht-infizierter Kulturen.

ZUSAMMENFASSENDE BETRACHTUNG

Den Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit stellte das Fernziel dar, die Rolle der extrazellulären Matrix in Entwicklungsprozessen verstehen zu lernen. Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Zelldifferenzierungszustand und Matrixstruktur sollten hierfür die Grundlage bilden. Für diese Fragestellung wurden Zellkultursysteme ausgewählt, in denen bisherige Untersuchungen Hinweise auf eine Einwirkung der extrazellulären Matrix auf den Entwicklungsablauf gegeben haben. Weitere Informationen über die Funktion der ECM sollten durch "Störung" der Differenzierungsprozesse erhalten werden. Da keine Mutanten zur Verfügung standen, wurde hierzu die Knorpel- und Muskeldifferenzierung durch das Kokarzinogen PMA bzw. durch Virustransformation reversibel unterdrückt und der Einfluß auf die Ausbildung der extrazellulären Matrix beobachtet. Die untersuchten Zellkultursysteme sind in Abb. 105a-h einander gegenübergestellt; das der Abb. 105b wurde hier erstmals beschrieben.

Untersuchung der Knorpeldifferenzierung von Mesenchymzellen.

- a) Embryonale Gliedmaßenmesenchymzellen differenzieren in Mikromassenkultur in hohem Prozentsatz zu Knorpel, verbunden mit einem Übergang von Typ I auf Typ II Kollagensynthese. Die Zellen deponieren in vitro anfangs ein dichtes, extrazelluläres Geflecht von Typ I Kollagen/Fibronektin. Nach Einsetzen der Chondrogenese wird dieses Netzwerk in zunehmendem Maß wieder abgebaut und durch die Komponenten der Knorpelmatrix ersetzt.
- b) Das Kokarzinogen PMA unterdrückt die Deponierung eines Netzwerkes von Typ I Kollagen/Fibronektin in Mesenchymzellkulturen und blockiert die Chondrogenese. Nach Rückkehr zu Normalbedingungen

KNORPELDIFFERENZIERUNG

MUSKELDIFFERENZIERUNG

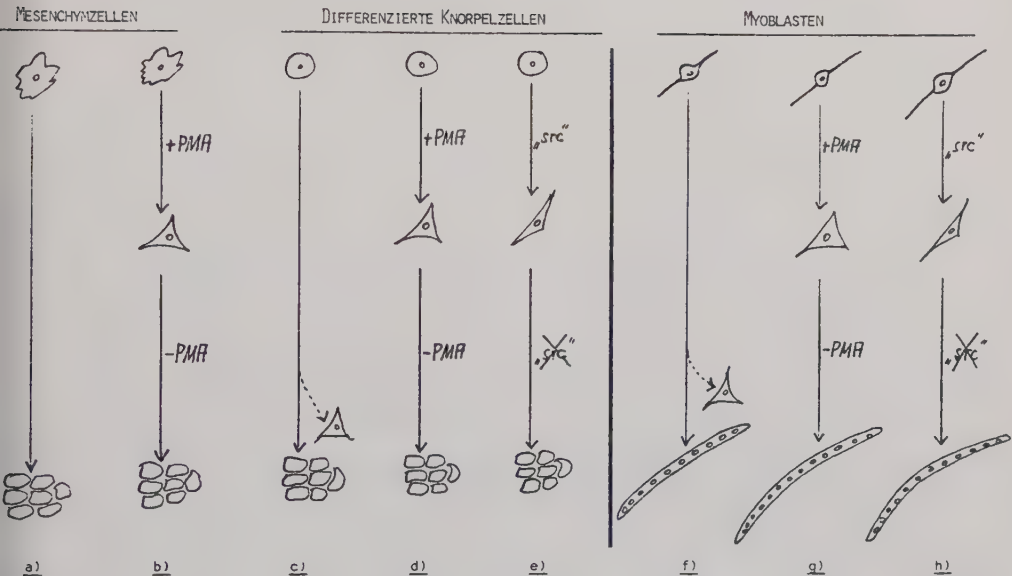


Abb. 105: Gegenüberstellung der Zellkultursysteme der Knorpel- und Muskeldifferenzierung.

- a) Embryonale Mesenchymzellen differenzieren zu Knorpel.
- b) Das Kokarzinogen PMA unterdrückt die Chondrogenese reversibel.
- c) Nach Freisetzung aus der Knorpelmatrix exprimieren Chondrozyten ihren Phänotyp in vitro. Einige Zellen erleiden dabei "Dedifferenzierung".
- d) PMA verhindert reversibel die Ausbildung des Knorpelphänotyps.
- e) Die Expression des viralen "src"-Gens blockiert reversibel die Ausprägung des Knorpelphänotyps.
- f) Einkernige Myoblasten differenzieren zu vielkernigen Muskelschläuchen. Einige Zellen erleiden dabei "Dedifferenzierung".
- g) PMA unterdrückt die Muskeldifferenzierung reversibel.
- h) Die Expression des viralen "src"-Gens führt zu einer reversiblen Blockierung der Myogenese.

wird zunächst wieder ein Geflecht von Typ I Kollagen/Fibronektin abgelagert. Später erfolgt die Bildung von Zellaggregaten und das Einsetzen der Knorpeldifferenzierung. Der hier beobachtete Zusammenhang zwischen Matrixablagerung und Differenzierungsablauf weist auf eine Funktion des Typ I Kollagen/Fibronektin Netzwerkes während der Chondrogenese hin.

Untersuchung der Rekonstitution der Knorpelmatrix differenzierter Chondrozyten.

- c) Es ist bekannt, daß Chondrozyten nach Freisetzen aus der Knorpelmatrix mittels Trypsinbehandlung ihre Matrix - bestehend aus Typ II Kollagen und Chondroitinsulfat-Proteoglykan - in vitro rekonstituieren können. Hier wird gezeigt, daß Knorpelzellen, die in vivo kein Fibronektin mehr besitzen, nach Entfernen der Matrix die Fibronektinsynthese wieder aufnehmen. Fibronektin bildet kurze, polygonale Zellen verbindende Stränge aus; mit zunehmender Anhäufung der Knorpelmatrix wird es wieder abgebaut. Chondrozyten, die in vitro zu fibroblastenähnlichen Zellen "dedifferenzieren", zeigen neben der Umschaltung von Typ II auf Typ I Kollagensynthese eine völlig umstrukturierte Matrix: Hier läßt sich ein dichtes Netzwerk langer Fasern von Typ I, Typ III, Typ V Kollagen und Fibronektin nachweisen.
- d) Das Kokarzinogen PMA blockiert reversibel den Aufbau der Knorpelmatrix differenzierter Chondrozyten. Die Synthese des knorpelspezifischen Typ II Kollagens ist stark reduziert, jedoch nicht völlig unterdrückt; PMA-behandelte Knorpelzellen synthetisieren daneben auch Typ I Kollagen. Das Ablagerungsmuster der Matrixproteine - Typ I, Typ III, Typ V Kollagen und Fibronektin bilden lange Fasern aus - gleicht dem "dedifferenzierter" Chondrozyten;

die Intensität der Immunfluoreszenzanfärbung PMA-behandelter Kulturen liegt jedoch wesentlich niedriger..

Während eine intakte extrazelluläre Matrix den Knorpelphänotyp stabilisiert, fördert PMA durch Blockierung des Matrixaufbaues die "Dedifferenzierung": Chondrozyten, die PMA für längere Zeit an der Matrixbildung hindert, wandeln sich irreversibel in fibroblastenähnliche Zellen um. Der stabilisierende Einfluß der Knorpelmatrix zeigt sich auch in der Tatsache, daß frisch trypsinierte, d.h. von der Matrix befreite Chondrozyten, durch PMA sehr rasch in fibroblastenähnliche Zellen überführt werden, während Chondrozyten in einer wohl ausgebildeten Knorpelkolonie erst nach längerer PMA-Einwirkung morphologische Veränderungen zeigen.

- e) Die reversible Expression des transformierenden "src"-Genes in Kulturen Virus-infizierter Chondrozyten reduziert stark den Anteil der Kollagen- an der Gesamtproteinsynthese und verhindert die Ausbildung der Knorpelmatrix. Zellen, kultiviert bei der nicht-permissiven Temperatur (41°C) weisen das normale Muster der Matrixproteine auf: Typ II und Typ V Kollagen werden intrazellulär gefunden, Typ I Kollagen ist nicht nachzuweisen; Fibronektin bildet kurze, Zellen verbindende Stränge aus. Transformierte Chondrozyten, gehalten bei der permissiven Temperatur (36°C), zeigen dagegen neben einer Änderung der Zellmorphologie zu spindelförmiger Gestalt nur vereinzelt eine sehr schwache, intrazelluläre Fluoreszenz für das knorpelspezifische Typ II Kollagen; etwa die Hälfte der Zellen reagiert jetzt schwach mit Antikörpern gegen Typ I Kollagen. Die Ablagerung von Fibronektin ist stark vermindert.

Untersuchung der Muskeldifferenzierung von Myoblasten.

- f) Im Verlauf der Myogenese fusionieren einkernige, spindelförmige Myoblasten zu vielkernigen Muskelschläuchen. Dieser Differenzierungsvorgang ist von einer Änderung im Synthesemuster der Matrixproteine begleitet. Einkernige Myoblasten reagieren mit Antikörpern gegen Typ I, Typ III, Typ V Kollagen und Fibronectin, vielkernige Muskelschläuche dagegen nur noch mit anti-Typ V Kollagen Antikörpern. Im Gegensatz zu differenzierten Knorpelzellen, die in vitro extrazelluläre Matrix anhäufen, wird die Matrix in Muskelzellkulturen von einkernigen Muskelvorläuferzellen, nicht aber von differenzierten Muskelschläuchen abgelagert; diese synthetisieren Komponenten der Basalmembran. Die Tatsache, daß Muskelvorläuferzellen Typ I, Typ III, Typ V Kollagen und Fibronectin produzieren und ablagern, läßt auf eine Funktion dieser Matrixbestandteile schließen. Nach früheren Untersuchungen besitzt die Matrix hier eine permissive Rolle als Haftsubstrat; ob sie zusätzlich weitergehende Funktionen ausübt, ist noch ungeklärt.
- g) Das Kokarzinogen PMA unterdrückt die extrazelluläre Ablagerung der Matrixproteine in Kulturen einkerniger Wachtelmyoblasten. Hiermit verbunden ist eine reversible Blockierung der Muskeldifferenzierung.
- h) Die Expression des transformierenden "src"-Genes in Kulturen Virus-infizierter Muskelzellen verhindert die Muskeldifferenzierung und den Aufbau der extrazellulären Matrix. In transformierten Myoblasten, gehalten bei der permissiven Temperatur (36°C) lassen sich die Matrixproteine nur schwach intrazellulär nachweisen. Nach Überführen der Kulturen auf die nicht-permissive Temperatur (41°C) wird das normale Differenzierungsprogramm eingeleitet.

Das Muster der Matrixproteine von Myoblasten und Muskelschläuchen gleicht jetzt dem nicht-infizierter Kulturen.

In allen hier untersuchten Entwicklungsmodellen war die Differenzierung bzw. die Expression der differenzierten Zellfunktion von einer weitgehenden Änderung im Ablagerungsmuster der Matrixproteine begleitet. Wurde durch das Kokarzinogen PMA oder durch Virustransformation die Ausbildung der extrazellulären Matrix verhindert, so war damit zugleich auch eine Blockierung des Differenzierungsvorganges verbunden. Dieser Befund unterstützt die Vorstellung, nach der die extrazelluläre Matrix eine Funktion in jenen Differenzierungsprozessen ausübt. Es bleibt künftigen Untersuchungen vorbehalten, die Rollen der einzelnen Matrixkomponenten aufzuklären.

EXPERIMENTELLER TEIL

Zellkulturen

Für orientierende Vorversuche wurden befruchtete Hühnereier von den Brütereien Hölzl (Moosburg) und Looser (Dürnau) bezogen. Für die Experimente wurden dann "spezifisch keimfreie" Valo - Eier (Lohmann-Tierzucht, Cuxhaven) verwandt.

Mesenchymzellkulturen

Mesenchymzellen wurden aus den vorderen und hinteren Gliedmaßenanlagen von 4-tägigen Hühnerembryonen gewonnen. Nach Entnahme der Embryonen wurden die Gliedmaßenanlagen unter dem Stereomikroskop frei gelegt. Nur Anlagen bis zum Stadium 23 (Hamburger und Hamilton, 1951) wurden präpariert und in Ham's F12 Medium (Seromed, München) gesammelt. 40 - 50 Gliedmaßenanlagen wurden mit 0,25% Trypsin in Ca, Mg- freier Saline, pH 7,5, für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Trypsinlösung mit einer Pasteurpipette abgezogen und die Anlagen zweimal vorsichtig mit komplettem F12 Medium (incl. 10% fötalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin - Streptomycin und 100 µg/ml Natriumascorbat) gewaschen. Die Gliedmaßenanlagen wurden in 2 ml komplettem F 12 Medium suspendiert und für 12 Sekunden auf höchster Stufe vortext. Die erhaltene Zellsuspension wurde zur Entfernung von Aggregaten durch 2 Lagen von 20 µm Nylonnetz und durch eine Lage optisches Linspapier filtriert.

Die Etablierung der Mikromassenkulturen erfolgte unter Modifizierung der Vorschrift von Ahrens et al. (1977). Die Zellsuspension wurde hierzu im Haemocytometer gezählt und auf 10^7 Zellen / ml eingestellt. Mithilfe einer Kapillarpipette wurde ein 50 µl Tropfen (entsprechend 5×10^5 Zellen) in das Zentrum einer 35 mm Gewebekulturschale plaziert. Ein angefeuchtetes Filtrierpapier an der Unterseite des Schalendeckels verhinderte das Austrocknen. Nach einer Stunde Inkubation

im Brutschrank waren die Zellen angehaftet. Nun wurde das Filtrierpapier entfernt und die Gewebekulturschale mit 2 ml Medium "geflutet". Es erfolgte täglicher, kompletter Medienwechsel.

Klonkulturen wurden in komplettem F 12 Medium mit 20% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum angesetzt (nach Dienstman und Holtzer, 1974, verändert). 10^3 bis 10^4 Zellen wurden auf 10 cm Gewebekulturschalen (Falcon, Nunc) oder auf 6 cm "Petriperm" - Schalen (Heraeus) ausgesäht. Jeden vierten Tag wurde das Medium zur Hälfte gewechselt.

Chondrozytenkulturen

Chondrozyten wurden aus den Sterna 17 - tägiger Hühnerembryonen isoliert (Dehm und Prockop, 1973, verändert). Zehn Sterna wurden mit 0,1% Kollagenase / 0,25% Trypsin in Ca, Mg - freier Saline im Wasserbad bei 37°C geschüttelt. Nach 30 min war das das Sternum umhüllende Perichondrium abgebaut. Die Sterna wurden zweimal mit Saline gewaschen, und die Trypsin / Kollagenase - Behandlung dann fortgesetzt. Nach weiteren 90 min wurde die Enzymlösung vorsichtig abpipettiert, und die Sterna behutsam zweimal mit komplettem F 12 Medium gewaschen. Anschließend wurden sie in 20 ml komplettem F 12 Medium suspendiert und für 20 Sekunden auf höchster Stufe gevortext. Die Zellsuspension wurde durch 2 Lagen von 20,µm Nylonnetz und durch 2 Lagen optisches Linspapier filtriert. Nach Zählung im Haemocytometer wurden die Chondrozyten in der gewünschten Dichte (10^4 - 10^6 Zellen / 10 cm Schale) mit 7,5 ml Medium in 10 cm Gewebekulturschalen ausgesäht. Entsprechend der Zelldichte wurde das Kulturmedium alle 1 - 3 Tage komplett gewechselt.

PMA - Behandlung

PMA - das stärkste bekannte Kokarzinogen - wurde unter Beachtung extremer Vorsicht im Abzug in DMSO zu 2 mg/ml gelöst. Diese Vorrats-

Lösung wurde unter Lichtabschluß bei -70°C aufbewahrt. Mittels einer Drummond - Kapillarpipette (Bachhofer) wurde die gewünschte Menge PMA-Lösung zu einer Flasche mit frischem Kulturmedium gegeben und steril filtriert. Das normale Kulturmedium erhielt als Kontrolle einen Zusatz von reinem DMSO. Die Endkonzentration von DMSO im Kulturmedium lag stets unter 0,1%. Entsprechend der Zelldichte und der hiervon abhängigen Metabolisierungsrate wurden die Zellkulturen 1 - 2 mal täglich mit PMA - ergänztem Kulturmedium gefüttert.

Transformierte Chondrozyten und Myoblasten

Die Experimente mit transformierten Zellen wurden von mir im Labor von Dr. Holtzer, Philadelphia, unter Mitwirkung von Dr. Boettiger (Viruspräparation) und Dr. West (Zellkultur) durchgeführt. Die Transformation erfolgte nach der Vorschrift von Pacifici et al. (1977). Hierzu wurden Hühnerchondrozyten, kultiviert als "Floaters", abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und in 0,25% Trypsinlösung suspendiert. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen abzentrifugiert und in Medium aufgenommen, daß 10^7 FFU/ml der ts LA24A - Mutante der Prager Linie des Rous Sarcoma Virus enthielt (Wyke, 1973). Die Viren wurden eine Stunde bei Raumtemperatur adsorbieren gelassen, und die Zellen anschließend in einer Dichte von 5×10^5 Zellen je 10 cm Kulturschale ausgesät. Die transformierten Zellen wurden in separaten Brutschränken bei 36°C (permissive Temperatur) und bei 41°C (nicht-permissive Temperatur) kultiviert. Die Kulturen wurden jeden zweiten Tag mit DMEM - Medium mit 10% fötalem Kälberserum gefüttert.

Myoblasten wurden aus dem Brustmuskel von 10 - tägigen Hühnerembryonen erhalten und auf Kollagen - beschichteten Gewebekulturschalen wachsen gelassen. Nach Infektion mit der ts LA24A Mutante des RSV - Virus wurden die Zellkulturen bei 36°C bzw. bei 41°C kultiviert (Holtzer et al., 1975).

Myoblastenzellkulturen

Muskelzellen wurden nach Lipton (1977a) aus dem Brustmuskel von 9 - tägigen Embryonen der japanischen Wachtel gewonnen (Lieferant der Wachteleier: Gräfliche Gutsverwaltung Schomberg). Das Gewebe wurde fein zerfasert und für 30 sec in komplettem Medium heftig gevortext (Caplan, 1976). Die erhaltene Zellsuspension wurde durch drei Lagen Nylonnetz und durch 2 Lagen optisches Linsenpapier filtriert. Zur Beschichtung der Gewebekulturschalen wurden 50 µl einer Lösung von 10 mg/ml Hühnerkollagen Typ I oder - in einigen Experimenten - Typ II auf den 10 cm Kulturschalen verstrichen, trocknen gelassen und UV - sterilisiert. Die Muskelzellen wurden in Dichten zwischen 2×10^2 (klonale Dichte) und 1×10^6 Zellen (Massenkultur) je 10 cm Schale ausgesät. In einigen Experimenten wurden die Zellen nach 24 h mittels 0,025% Trypsin oder 0,4 U/ml Dispase I (Boehringer) passagiert. Das Kulturmedium war DMEM mit 10% "ausgewähltem" Pferdeserum 5% Embryoextrakt und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin.

Die Qualität der Pferdeseren wurde in Klonierungstests ermittelt. Neun Pferdeserum - Chargen verschiedener Hersteller (Seromed, Gibco Bio-Cult, Flow) wurden in Muskelzellkulturen auf wachstumsfördernde, den Myoblastenphänotyp stabilisierende Eigenschaften hin getestet. Bei hohen Zelldichten waren alle Chargen annähernd gleich. Bei einer Dichte von 5×10^4 Zellen / Platte zeigten sich bereits deutliche Unterschiede, und bei klonaler Dichte (5×10^2 Zellen / Platte) erlaubten nur zwei Serum - Chargen (Nr. 028, 029 von Seromed) klonales Wachstum. Diese Seren wurden für alle Experimente verwandt.

Zeitverlaufsstudien

Zur Beobachtung von Zellwachstum, Differenzierung und der Wirkung von Kokarzinogenen mußten ausgewählte Punkte auf Gewebekulturschalen

wiederholt fotografiert werden, um so - wie in einem Film - den Ablauf zu verfolgen. Hierzu wurden der Objektisch des inversen Kameramikroskopes ICM 405 (Zeiss) mit einem Punkt, und jede Gewebekulturschale seitlich mit dem Diamantmesser gekennzeichnet. Wurden beide Markierungen zur Deckung gebracht, war die Lage der Petrischale nur von der eingestellten Verschiebung des Mikroskop - Objektisches abhängig. Diese konnte mittels zweier Mikrometerskalen exakt protokolliert und reproduziert werden. Das beschriebene Verfahren ermöglichte es, in einer Vielzahl von Gewebekulturschalen gleichzeitig die zeitliche Entwicklung von ausgewählten Zellen oder Zellgruppen fotografisch zu verfolgen. Nach Abschluß der Beobachtung wurden die Gewebekulturplatten mit eiskaltem Methanol fixiert und mit Antikörpern angefärbt (siehe Abschnitt "Immunhistologie"). Nach korrekter Positionierung auf dem Mikroskop - Objektisch konnte dann die Immunfluoreszenz der Zellen oder Zellgruppen fotografiert werden, deren "Vorgeschichte" in der vorangegangenen Zeitverlaufsstudie beobachtet worden war.

Radioaktive Inkubationsmedien

Radioaktive Inkubationsmedien enthielten als Zusatz entweder 20 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{35}S -Methionin (945 Ci/mMol), 15 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Glycin (20 Ci/mMol), 3 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{14}C -Proteinhydrolysat (62 mCi/mAtom), 10 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Glukosamin (23 Ci/mMol, alle vier Substanzen von Amersham Buchler, Braunschweig) oder 20 $\mu\text{Ci/ml}$ L-(2,3- ^3H)- Prolin (30 - 35 Ci/mMol, von New England Nuclear, Dreieichenhain).

Inkubationsmedien zur Kollagenmarkierung wurden ergänzt durch Natriumascorbat (100 $\mu\text{g/ml}$) und 50 $\mu\text{g/ml}$ β -Aminopropionitril. Die Markierungsdauer betrug in der Regel 12 - 24 h. Nach Ende der Inkubation wurde das Kulturmedium abgesaugt, mittels einer konzentrierten Inhibitor - Stammlösung auf 0,015M EDTA, 0,01M N-Äthylmaleimid und 0,005M Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) gebracht und eingefroren.

Die Zellschicht wurde mit wenig frischem Medium abgespült, unter Zusatz von 2 ml PBS (incl. der drei genannten Inhibitoren) mit einem Gummischaber abgelöst und eingefroren.

Pepsinabbau

Zur Abtrennung des Kollagens von globulären Proteinen wurden die Proben einem schonenden Pepsinabbau unterworfen - hierbei werden nicht-tripelhelikale Proteine und die Propeptide des Kollagens abgebaut. Die Proben wurden zuerst mit Eisessig auf eine Konzentration von 0,5M gebracht, und der pH mit 6 N HCl auf 2,0 eingestellt. Der Abbau wurde dann mit 0,1 - 0,2 mg Pepsin / ml für 48 h bei 4°C durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mit 6 N NaOH auf pH 8,5 gebracht und in der Kälte 2 h stehen gelassen. Zur Inaktivierung ev. verbliebener Pepsin - Restaktivität wurden sie dann sehr schnell für 30 sec auf 100°C erhitzt. Ein kleiner Teil der Probe wurde für die spätere SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ("SDS-PAGE") gegen Wasser (incl. 0,002 M PMSF) dialysiert und lyophilisiert. Der Hauptteil der Proben wurde zur Vorbereitung der Ionenaustauscherchromatographie mit 4 mg lathyritischem Rattenhautkollagen als Träger gegen 0,08 M Natriumazetatpuffer, pH 4,8, dialysiert.

Ionenaustauscherchromatographie

Zur Auftrennung der Kollagen α -Ketten wurden die pepsinbehandelten, dialysierten Proben mit dem gleichen Volumen 8 M Harnstofflösung versetzt und für 20 min bei 45°C denaturiert. Anschließend wurden sie auf eine Säule (1,5 x 10 cm) von CM - Cellulose (CM 52, Whatman), äquilibriert mit 0,04 M NaAc, pH 4,8, 4 M Harnstoff, aufgetragen. Die Elution wurde bei 40°C mit einem linearen Gradienten von 0 bis 0,1 M NaCl über ein Gesamtvolumen von 500 ml durchgeführt. Die Absorption des Elats wurde kontinuierlich bei 206 nm mit dem LKB Uvichord III

gemessen. Den aufgefangenen Fraktionen zu je 8 ml wurden Aliquots von 1 ml entnommen, mit 10 ml Biofluor (New England Nuclear) versetzt und im Beckman LS 250 Szintillationszähler gemessen. Nach Auswertung des Chromatogramms wurden ausgewählte Fraktionen vereinigt, gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert.

Bromcyanabbau (nach Epstein et al., 1971)

Die lyophilisierten Proben wurden in 70%iger Ameisensäure für 30 min bei 45°C denaturiert und unter Stickstoff mit Bromcyan für 4 h bei 30°C gespalten. Durch Lyophilisieren in einer Vakuumzentrifuge (Savant) wurden die Peptide von BrCN und Ameisensäure befreit. BrCN und Ameisensäure wurden dabei in einer auf -70°C gekühlten Falle und in einem mit NaOH - Perlen gefüllten Rohr sicher aufgefangen.

SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese ("SDS-PAGE")

Die markierten Proteine wurden in einem diskontinuierlichen Slabgelelektrophoresesystem (Laemmli, 1970) mit 3%igem Obergel aufgetrennt. Die Konzentration an Vernetzer (Bis-Acrylamid) betrug 0,8% bezogen auf Acrylamid. Für ganze Kollagen α -Ketten wurde ein 6%iges Trenngel, für BrCN - Peptide ein linearer Gradient von 10 - 18% und für Gesamtzellproteine ein linearer Gradient von 5 - 18% Acrylamid verwandt. Die Proben wurden in 3% SDS, 0,01 M Natriumphosphat, pH 7,2, 8 M Harnstoff, 0,1 M Dithioerythrit, 0,002 M PMSF gelöst und für 3 min gekocht. Die Elektrophorese wurde dann in einem Slabgel mit einer Laufstrecke von 14 cm durchgeführt, bis der dem Laufpuffer zugegebene Farbstoff Bromphenolblau die Front erreichte. Bei einer Spannung von 70 Volt war der Lauf nach 12 - 14 h im Kühlraum beendet.

In späteren Experimenten wurde die Elektrophorese in dem "Havanna" Gerät (Desaga, Heidelberg) durchgeführt. Zwei Doppeltrennplatten mit einer Laufstrecke von 10 cm ermöglichten hier die gleichzeitige

Analyse von 96 Proben. Dank der intensiven Kühlung der Trennkammern konnte mit hohen Spannungsgradienten gearbeitet werden, was zu kurzen Laufzeiten und guter Trennschärfe führte. Bei 120 Watt konstant gehaltener Leistung - die Spannung war auf max. 400 Volt begrenzt - betrug die Laufzeit 70 Minuten. Der externe Kühlkreislauf wurde mit Kühlttemperaturen zwischen -10°C und -15°C so einreguliert, daß die Temperatur des zwischen dem oberen und unteren Pufferreservoirs umgewälzten Laufpuffers etwa 4°C betrug.

Lokalisierung und Quantifizierung radioaktiver Gelbanden

^{131}J - markierte Proteinbanden wurden durch Autoradiographie auf "Kodirex" Röntgenfilm (Eastman Kodak Co.) lokalisiert. ^3H , ^{14}C oder ^{35}S - markierte Banden wurden durch Fluorographie (Bonner und Laskey, 1974) auf blauempfindlichem "Regulix" Röntgenfilm (Eastman Kodak Co.) nachgewiesen. Hierbei wurde der Röntgenfilm durch Vorbelichten mit einem Elektronenblitz sensibilisiert (Laskey und Mills, 1975). Die Vorbelichtung wurde so durchgeführt, daß die Untergrundsschwärzung ("Schleier") des sensibilisierten Filmes um eine Extinktion von 0,15 bis 0,20 gegenüber dem unbehandelten Film angehoben wurde. Die Proteinmuster wurden dann mit dem Joyce - Loebel - Mikrodensitometer (Joyce, Loebel und Co., Gateshead-on-Tyne, England) ausgewertet.

Die Frage, ob und in welchem Schwärzungsbereich fluorographisch lokalisierte Banden quantitativ vermessen werden können, wird im wesentlichen durch den verwendeten Film, das Densitometer und die grundlegenden Eigenschaften photographischer Prozesse bestimmt.

Röntgenfilme besitzen einen sehr hohen maximalen Schwärzungsgrad (vergl. Abb.106); sie arbeiten noch bei Dichten weit über 2,0 linear - in diesem Bereich ist das Meßverhalten des Densitometers limitierend. Wird die hochenergetische Strahlung nicht direkt vom Film nachgewiesen,

sondern mittels Verstärkerfolie oder Szintillatoren in blaue Fluoreszenzstrahlung umgewandelt und vom Film als "Fotographie" registriert, so weisen die Schwärzungskurven den für photographische Prozesse charakteristischen S-förmigen Verlauf auf (Abb. 106, 107) mit dem nicht-linearen Teil im Bereich der niedrigen Dichte. Geringe Radioaktivitätsmengen werden daher durch Fluorographie unterbestimmt (Abb. 107) - im Extremfall bis zum Faktor 30 (Laskey und Mills, 1975). Wird dagegen der registrierende Film auf einen bestimmten Betrag an Untergrundschwärzung hin vorbelichtet, so bewirkt diese Hypersensibilisierung nicht nur eine wesentliche Empfindlichkeitssteigerung, sondern auch eine lineare Beziehung zwischen Radioaktivitätsmenge je Flächeneinheit und Schwärzung des fluorographischen Bildes (Abb. 108). Hervorzuheben ist besonders, daß dies nur für einen bestimmten Vorbelichtungsgrad gilt: die Untergrundschwärzung sollte hierdurch um eine Dichte von 0,1 bis 0,2 gegenüber dem unbehandelten Film angehoben werden (Laskey und Mills, 1975).

Der nutzbare Meßbereich des Joyce - Loebel - Mikrodensitometers wurde mittels eines Stufengraukeils ermittelt (Abb. 109a,b). Hierbei wurde bestimmt, wieviele Graustufen zu je 0,15 Extinktionswerten - in Abhängigkeit vom eingesetzten Meßgraukeil - registriert wurden. Das lineare Meßverhalten des Densitometers wurde mit Verlaufsgraukeilen unterschiedlicher Schwärzungen (Abb. 109c) überprüft - zugleich diente dies der Kontrolle neuer Densitometer - Graukeile. Als Ergebnis der Messungen wurde festgestellt, daß das Joyce - Loebel - Mikrodensitometer mit den zur Verfügung stehenden Verlaufsgraukeilen im Meßbereich zwischen Null und 2,1 Extinktionswerten linear anzeigte.

Ein weiterer wichtiger Faktor für die densitometrische Auswertung ist die Geometrie des Meßspaltes. Die Spaltbreite wurde mit 50 μm

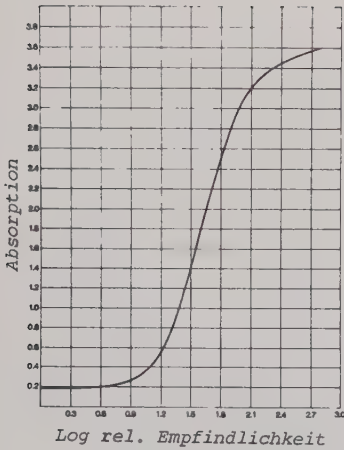


Abb. 106: Charakteristische Schwärzungskurve eines Röntgenfilmes in Abhängigkeit von der Belichtung.

(Kodak X-Omat mit Verstärkerfolie)

Die Verstärkerfolie wird von der Röntgenstrahlung zu blauer Fluoreszenzstrahlung angeregt. Die Schwärzungskurve des Filmes weist den typischen S-förmigen Verlauf auf, der für photographische Prozesse charakteristisch ist.

Quelle: Kodak Radiographie-Information: Produkte für die Mammadiagnostik.

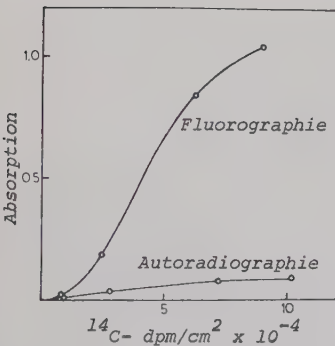


Abb. 107: Abhängigkeit der Schwärzungskurve eines Röntgenfilmes von der autoradiographischen und fluorographischen Exponierung von ^{14}C .

^{14}C wird autoradiographisch mit linearer Dosis-Wirkungsbeziehung registriert. Die fluorographische Exponierung bei -70°C auf nicht vorbelichteten Röntgenfilm erhöht die Nachweisempfindlichkeit allgemein; diese Steigerung wirkt sich am wenigsten auf den Nachweis von kleinsten Radioaktivitätsmengen aus - sie werden im durchhängenden Teil der S-Kurve, dem "Schwellengebiet" beträchtlich unterbestimmt.

Quelle: Laskey und Mills, 1975

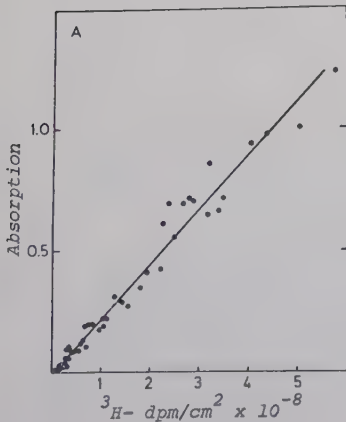


Abb. 108: Schwärzungskurve eines vorbelichteten Röntgenfilmes bei fluorographischer Exponierung von ^3H .

^3H und ^{14}C (hier nicht gezeigt) werden bei fluorographischer Exponierung bei -70°C auf vorbelichtetem Film mit gesteigerter Empfindlichkeit und mit linearer Dosis-Wirkungs-Beziehung registriert. Die Vorbelichtung wird auf eine Untergrundschwärzung von 0,15 - bezogen auf den unbehandelten Film - durchgeführt. Bei niedrigerem bzw. höherem Vorbelichtungsgrad (hier nicht gezeigt) werden kleinste Radioaktivitätsmengen unter- bzw. überbestimmt.

Quelle: Laskey und Mills, 1975

konstant belassen - bei normal dimensionierten Gelen ließ sich durch eine geringere Spaltbreite keine erhöhte Auflösung erreichen. Die Spaltlänge wurde auf etwa 50 - 70% der Bandenbreite eingestellt. Gelegentlich beobachtete man eine asymmetrische Verteilung des Proteins über die Bandenbreite - ein Effekt, der vermutlich auf Konvektionsströmungen zu Beginn der Disk - Elektrophorese zurückzuführen war. Da die Länge des Meßspaltes aus meßtechnischen Gründen geringer als die Bandenbreite eingestellt werden mußte, ließen sich derartig ungleichmäßig verteilte Banden nicht auswerten. Es wurden daher nur Gele für die Quantifizierung herangezogen, bei denen auf gleichförmige Verteilung zwischen Bandenmitte und Bandenseite (Abb. 110b,c) geprüft worden war. Die Abb. 110a,d zeigt gleichzeitig, welche Meßfehler entstehen könnten, wenn der Lichtstrahl während der Messung über den linken bzw. rechten Bandenrand hinaus gerät. Derartige Zentrierungsfehler ließen sich beim Joyce - Loebel - Mikrodensitometer leicht vermeiden, da die Bande und der Ausschnitt, der vom Spalt gebildet wurde, auch während der Messung auf einem Projektionsschirm abgebildet waren.

Die Flächen unter den Banden wurden mit einem elektronischen Planimeter ("Electronic graphic calculator", Numonics Corp., North Wales, Pa., USA) als Mittelwerte von Fünffachmessungen bestimmt. Die Standardabweichung betrug 1 - 2% und bei kleinen Flächen unter einem cm^2 5 - 10%.

Bei Beachtung der oben diskutierten Punkte erwies sich die densitometrische Auswertung fluorographisch lokalisierter Gelbanden als eine sehr genaue und reproduzierbare Analysenmethode.

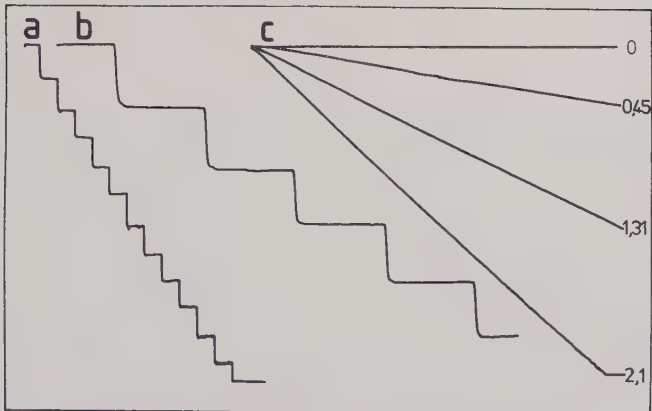


Abb. 109: Prüfung und Eichung des Densitometers mit Stufen- und Verlaufsgraukeilen.

Die Eichung und Prüfung des linearen Anzeigegebietes erfolgte mit einem Stufengraukeil (Agfa-Gaevert) mit einer Schwärzungsänderung von 0,15 je Stufe. In Abhängigkeit vom auswechselbaren Densitometer - Verlaufsgraukeil ergaben sich unterschiedliche lineare Arbeitsbereiche: in (a) wurden z.Bsp 11 Stufen (entsprechend einem Extinktionsbereich bis 1,65) und in (b) 5 Stufen (entsprechend einem Extinktionsbereich bis 0,75) linear registriert. Neue Densitometer - Graukeile wurden vor ihrer Verwendung mittels eines bereits vermessenen Graukeils auf linearen Verlauf hin überprüft (c); die Zahlenangaben beziehen sich auf den Nennarbeitsbereich der Verlaufsgraukeile.

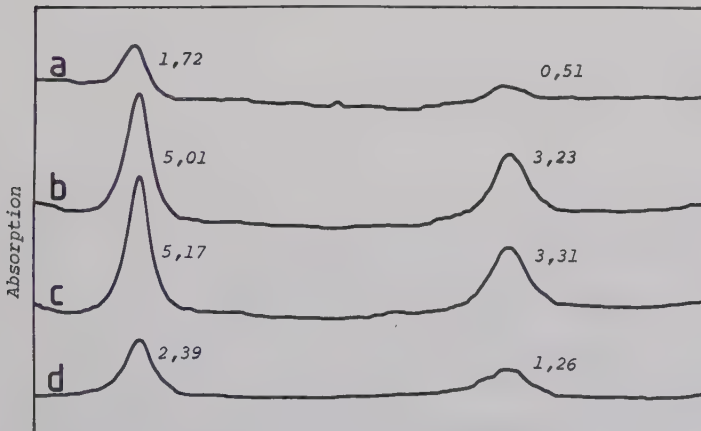


Abb. 110: Prüfung auf Asymmetrie von Gelbänden.

Die Spaltlänge des Densitometers wurde hierbei auf 40% der Bandenbreite eingestellt und die linke (b) bzw. rechte (c) Bandenseite vermessen. Die Zahlenangaben sind die im elektronischen Planimeter gemessenen Flächen. Wird zur Demonstration über den linken (a) bzw. rechten (d) Bandenrand hinaus geskannt, so ergeben sich erwartungsgemäß falsche Flächenwerte - ein Hinweis auf die Bedeutung korrekten Zentrierens bei der densitometrischen Auswertung.

Bestimmung des Hydroxyprolin / Prolin Verhältnisses

Ein Anteil der ^3H - markierten Proben wurde gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert. Anschließend wurde mit 1 ml 6 N HCl bei 108°C für 24 h unter Stickstoffatmosphäre hydrolysiert. Nach Entfernen der Salzsäure wurden die Aminosäuren an einem M - 82 Analysator (Beckman Instruments) aufgetrennt. Anteile zu je 1 ml der Eluat - Fraktionen wurden entnommen, mit 10 ml Biofluor (New England Nuclear) versetzt und gezählt. Aus der Gesamtradioaktivität im Hydroxyprolin (Hyp)- und Prolin (Pro)- Bereich wurde der Anteil von Kollagen am Gesamtprotein berechnet:

$$\% \text{ Kollagen} = \frac{2 \times \text{Hyp}_{\text{cpm}}}{(\text{Pro}_{\text{cpm}} - \text{Hyp}_{\text{cpm}}) \times 5 + 2 \times \text{Hyp}_{\text{cpm}}} \times 100$$

Die Formel berücksichtigt, daß Kollagen etwa fünfmal mehr Prolin enthält als andere Proteine (Dayhoff und Hunt, 1972; Jukes et al., 1975), und daß das Verhältnis von Hydroxyprolin zu Prolin in den Hühnerkollagentypen annähernd 1 : 1 beträgt (Miller et al., 1969; Herrman und von der Mark, 1975; von der Mark und von der Mark, 1979).

Immunpräzipitation

Zum Nachweis von Fibronektin und Kollagen in der Zellschicht oder im Kulturmedium diente die Immunpräzipitation. Hierzu wurde das Kulturmedium auf eine Konzentration von 0,002 M PMSF gebracht und gegen PBS, pH 7,2, 0,002 M PMSF dialysiert. 100 μl dialysiertes Medium wurden mit dem gleichen Volumen 0,1%iger Serumalbuminlösung versetzt und mit 10 - 15 μg Meerschweinchen Antikörpern gegen Typ I bzw. Typ II Kollagen (von der Mark und von der Mark, 1977) oder mit 20 μg Kaninchen Antikörpern gegen Fibronektin (Dessau et al., 1978) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 10 μl Kaninchen- bzw. Meerschweinchen-normalserum als Träger hinzugegeben, gefolgt von 600 μl Ziegen anti -

Kaninchen (bzw. Ziegen anti - Meerschweinchen) γ -Globulin Antiserum. Das Präzipitat, das sich nach 16-stündiger Inkubation bei 4°C gebildet hatte, wurde bei 3000 xg für 10 min abzentrifugiert, zweimal mit 0,01 M NaCl, 0,1 M Tris - HCl, pH 7,4, 0,1% Serumalbumin gewaschen und durch Kochen in SDS - PAGE - Probenpuffer gelöst.

Ein Nachteil der Immunpräzipitation mit präzipitierendem, zweiten Antikörper liegt in der relativ großen Probenmenge, die in Elektrophoresepuffer gelöst werden muß. Da hiervon nur ein Bruchteil auf die SDS - PAGE aufgetragen werden kann, ist die Gesamtnachweisempfindlichkeit recht gering. Diesen Nachteil überwindet die von Kessler (1975, 1976) entwickelte Methode, die auf der starken Affinität von Protein A, einem Proteinbestandteil von Bakterienwänden, zu IgG - Molekülen beruht. Hierbei werden Formaldehyd - fixierte Bakterien dazu benützt, Antigen - Antikörper - Komplexe aus Lösungen zu binden. Zur Durchführung der nach Kessler (1976) modifizierten Methode wurden 100 μ l einer 10%-igen Suspension von Staphylococcus Aureus Bakterien (CalBiochem) zweimal in 0,5% Nonidet P-40 ("NP-40", Fluka), 1 mg/ml Serumalbumin in PBS gewaschen. Zu 200 μ l markiertem Kulturmedium wurden 10 μ l 10%-iges NP-40 und 1 - 5 μ l unverdünntes Antiserum gegeben und bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert. 5 - 25 μ l gewaschene Bakteriensuspension wurden dann hinzugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur durch gelegentliches Schwenken suspendiert gehalten. Die Bakterien - Immunkomplexe wurden bei 4°C und 3000 xg für 10 min abzentrifugiert und zweimal in 0,02 M Tris - HCl, pH 7,5, 0,05 M NaCl, 0,5 % NP-40, 0,5% Natriumdesoycholat, 0,002M PMSF und einmal in 0,01 M Tris-HCl, pH 7,2 gewaschen. Die Bakterien wurden in 20 μ l SDS - PAGE - Probenpuffer suspendiert, für 3 min gekocht, abzentrifugiert, und der Überstand auf die Elektrophorese aufgetragen.

Die Immunpräzipitation von zellgebundenem Fibronectin wurde nach der Methode von Olden und Yamada (1977) durchgeführt. Die Zellschicht einer 10 cm Petrischale wurde mit 2 ml 0,05 M Natriumphosphat, pH 11,0, 1% Triton X-100 homogenisiert, und der pH mit 6 N NaOH auf 11,0 eingestellt. Fibronectin ist bei diesem pH löslich (Yamada et al., 1977). Das Homogenat wurde für 2 h bei 4°C mit 25 000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde dann 10fach mit 0,1 M Natriumphosphat, pH 7,0, 1 % Triton X-100, 0,05 N NaCl verdünnt. Zu 4 ml des verdünnten Überstandes wurden 20 µl unverdünnter Kaninchen anti - Fibronectin Antikörper (Dessau et al., 1978; 2,6 mg/ml) gegeben und bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert. 2 ml von Ziegen anti - Kaninchen Serum wurden hinzugefügt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugieren bei 25 000 xg für 15 min erhalten und zweimal mit 0,1 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl, pH 7,4, 0,5% NP-40 gewaschen. Der Niederschlag wurde dann mit 300 µl 3%-igem SDS homogenisiert, und ein Anteil auf der SDS - PAGE aufgetragen.

Radioimmunassay

Zur Bestimmung der Syntheseraten von Typ I und Typ II Kollagen im Kulturmedium und der Zellschicht wurde ein Präzipitations - Radioimmunassay (von der Mark und von der Mark, 1977). Das Kulturmedium, vereinigt mit der Zellschicht, wurde gegen 1 M NaCl, 0,05 M Tris - HCl, pH 7,5, 0,002 M PMSF dialysiert. Nach Abzentrifugieren und Einstellen des Volumens wurden jedem Extrakt sieben Anteile entnommen - jeweils 60 000 - 200 000 cpm entsprechend. Die Anteile wurden mit 1 µl, 5 µl und 10 µl Meerschweinchen anti-Typ I bzw. anti-Typ II Kollagen Antikörpern versetzt; ein Extrakt erhielt als Kontrolle 10 µl Meerschweinchen - Normalserum. 100 µl (bei einem Extraktvolumen von 25 µl) bzw. 500 µl (bei einem Extraktvolumen von 200 µl) 0,15 M NaCl, 0,05 M Tris-

HCl, pH 7,5, 1% Serumalbumin wurden als Puffer hinzugegeben und bei Raumtemperatur stehen gelassen. 30 µl Meerschweinchen - Normalserum wurden als Träger hinzugefügt, 400 µl Ziegen anti- Meerschweinchenserum hinzugegeben und über Nacht bei 4°C stehen gelassen.

Die Proben wurden für 15 min bei 25 000 xg zentrifugiert, und die Niederschläge dreimal mit 0,1 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl, pH 7,4, 0,5% NP-40 gewaschen. Die Präzipitate wurden entweder durch Kochen in 800 µl 3% SDS, 6 M Harnstoff oder durch Schütteln mit 0,6 ml Protosol (New England Nuclear) bei 60 °C gelöst. Danach wurden 10 ml Biofluor (New England Nuclear) zugegeben und im Szintillationszähler gemessen. Die Quenchkorrektur wurde mittels der Methode des inneren Standards durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 50 µl tritiiertes Wasser bekannter Aktivität (Eichstandard, Amersham Buchler) zu den bereits gezählten Szintillationsgefäßen hinzugegeben. Nach erneutem Zählen wurden die dpm - Werte nach folgender Formel errechnet:

$$\text{dpm} = \frac{S (p_1 - H)}{P_2 - P_1}$$

S : dpm des hinzugegebenen Standards

H : Untergrund-Zählrate (background)

P₁: cpm der Probe beim ersten Zählen

P₂: cpm der Probe beim zweiten Zählen

(Die dpm - Werte des hinzugegebenen tritiierten Standards wurden entsprechend der Halbwertszeit von Tritium (12,35 Jahre) und der seit dem Kalibrierungstermin vergangenen Zeit korrigiert. In der angegebenen Formel ist ferner vorausgesetzt, daß p₁ und p₂ mit gleicher Zählraubeute gemessen werden. Dies wurde durch Kontrollen bestätigt: Das Hinzufügen von nur 50 µl Wasser verursacht im oben beschriebenen Zählsystem keine meßbare Erniedrigung der Zählraubeute.)

Die Auswertung der Ergebnisse zeigte, daß Typ I bzw. Typ II Kollagen in den aufgearbeiteten Zellkulturproben durch 10 µl unverdünnter Meerschweinchen - Antiseren praktisch vollständig gefällt wurden; der Zusatz von 25 µl Antiseren zu den höchst markierten Proben erbrachte nur eine Steigerung von 2 - 5% an präzipitierter Radioaktivität im Niederschlag.

Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde in parallel behandelten, nicht radioaktiv markierten Kulturen bestimmt. Hierzu wurde eine Lösung von 2,5 mg/ml Trypsin, 1 mg/ml Kollagenase (Seromed) in Ca, Mg - freier Saline auf die Zellschicht gegeben und 5 - 20 min bei 37°C einwirken gelassen. Nach wiederholtem, heftigen Pipettieren wurde die erhaltene Zellsuspension im Hämocytometer gezählt.

Enzymatische Jodierung der extrazellulären Proteine

Externe, frei zugängliche Proteine wurden durch enzymatische Jodierung markiert (Hubbard und Cohn, 1972). Die Zellkulturen wurden hierzu viermal mit Medium ohne Serum und einmal mit PBS, pH 7,2, gewaschen. Zwei ml PBS mit 0,02 M Glukose und 100 μ Ci/ml Na¹³¹I (20 Ci/mg, New England Nuclear) wurden zur Zellschicht gegeben. Die Reaktion wurde gestartet durch die Zugabe von 5U Laktoperoxidase (Sigma) und von 1,5 U Glukoseoxidase (Sigma), beide gelöst in 0,1 ml PBS. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen viermal mit kaltem PBS (incl. 0,002 M PMSF) gewaschen. 200 - 400 μ l SDS - PAGE-Probenpuffer wurden hinzugegeben, und der Zellrasen durch Kochen gelöst.

Immunhistologie

Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurden Gliedmaßenanlagen aus Hühnerembryonen präpariert, für 20 - 30 min in 5%-iger Sulfosalizylsäure fixiert, mit PBS gewaschen und über Nacht in PBS mit 10 - 15% Sucrose bei 4°C aufbewahrt. Die Anlagen wurden dann in Compound (Miles) auf Metallblöckchen rasch aufgefroren. 6 - 8 μ m dicke Gefrierschnitte wurden anschließend auf einem Kryotom (Südwestdeutsche Labor-einrichtung und Elektrotechnik GmbH, Mainz) hergestellt. Aggregate von Mesenchymzellen - erhalten durch Kultur über Agar - wurden

zweimal mit PBS gewaschen, sofort unfixiert in Compound eingebettet und geschnitten. Zellschichten wurden vorsichtig mit dem Gummischaber abgelöst, in 5%-iger Sulfosalizylsäure oder eiskaltem Methanol fixiert und in PBS mit 10% Sucrose für 30 min stehen gelassen. Nach dem Auffrieren in Compound wurden 6 - 8 μ m dicke Gefrierschnitte angefertigt.

Zellkulturen wurden für die spätere Immunfluoreszenz - Anfärbung zunächst fixiert. Sie wurden hierzu zweimal kurz mit PBS abgespült und mit eiskaltem Methanol für 10 min bei -15°C behandelt. Nach dem Abgießen des Methanols wurden die Platten lufttrocknen gelassen.

Zur Demaskierung antigenen Determinanten, die durch Proteoglykane abgedeckt waren, wurden parallel Gefrierschnitte bzw. Zellkulturen vor der Immunfluoreszenz - Anfärbung mit Hyaluronidase behandelt (von der Mark et al., 1976; von der Mark und von der Mark, 1977). 1000 U Hyaluronidase/ml wurden für 15 - 30 min einwirken gelassen, mit PBS abgespült, und die Proben anschließend mit Antikörpern angefärbt. Da Hyaluronidase - entsprechend ihrer Herstellung - mit unterschiedlichen Anteilen proteolytischer Enzyme verunreinigt ist, wurden drei verschiedene Präparationen getestet:

- a) Hyaluronidase aus Hammeltestes, 1000 U/mg (Serva, Nr. 25118),
 - b) Hyaluronidase aus Rindertestes, 9600 U/mg (Sigma, Nr. H 3631),
 - c) Hyaluronidase aus Rindertestes, 15 000 - 20 000 U/mg (Leo, Helsingborg, Schweden).
- Das unreinste Enzym (Serva) zeigte überraschenderweise die beste demaskierende Wirkung an (mechanisch stabilen) Gefrierschnitten vor der Anwendung der Antikörper gegen die Kollagentypen I, II und III. Das Protease - empfindliche Fibronektin blieb besser durch die hoch - gereinigten Präparate (Sigma oder Leo) erhalten. Gleichfalls überstanden labile Gewebsschnitte früher embryonaler Stadien die Behandlung mit diesen Enzympräparationen, während das von Serva angebotene Präparat zu einem teilweisen Verlust des Zusammenhaltes im Gewebsverband führte.

Die fixierten Gewebsschnitte oder die Zellkulturen wurden für die Immunfluoreszenz - Anfärbung mit einem 10 µl Tropfen spezifischer Antikörperlösung (0,02 bis 0,06 mg/ml) bedeckt und in einer feuchten Kammer für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Antigen - Antikörper - Komplexe mit Fluorescein (FITC) - konjugiertem anti - Kaninchen bzw. anti - Meerschweinchen IgG (Behringwerke; Verdünnung 1 : 20) angefärbt. Nach dem Waschen mit PBS, pH 10,5, wurden die angefärbten Proben mit einem Tropfen Glycerin : PBS, pH 10,5, und einem Deckglas bedeckt.

Für die Immunfluoreszenz - Doppelfärbung (von der Mark et al., 1976) wurde zuerst mit Kaninchen anti - Fibronektin Antikörpern, gefolgt von Rhodamin - konjugiertem Ziegen anti - Kaninchen γ -Globulin (Nordic) angefärbt. Nach einem Zwischenschritt - der Inkubation mit 1 : 10 verdünntem Kaninchennormalserum - wurde die Probe mit Meerschweinchen Antikörpern gegen Typ I bzw. Typ II Kollagen und abschließend mit FITC-konjugiertem Kaninchen anti-Meerschweinchen γ -Globulin (Behringwerke) behandelt.

Fototechnik

Immunfluoreszenzanfärbungen wurden im Zeiss Standard 19 Mikroskop oder dem inversen Kameramikroskop ICM 405 - ausgerüstet mit einem KP 490/500 Filter für FITC und mit einem BP 546/9 Filter für Rhodamin-Fluoreszenz - betrachtet. Schwarz-Weiß Fotos wurden auf Kodak Tri-X Film aufgenommen (Einstellung der Belichtungssteuerung auf 32 Din) und in Neofin-Rot (Tetenal) entwickelt. Farbfotos wurden auf Kodak Ektachrome-Professional 160 oder auf Ektachrome 400 Diafilm gemacht. Die Umkehrentwicklung wurde von einem Fachlabor (Engert Ektachrome, München) oder selbst mit dem UK-6 Prozess (Tetenal) durchgeführt. Die Belichtungssteuerung des Kameramikroskopes wurde bei Aufnahmen

auf Ektachrome 160 auf 23 - 29 Din und solchen auf Ektachrome 400 auf 27 - 33 Din eingestellt. Entsprechend der gewünschten Empfindlichkeit wurde die Verweilzeit der Filme im Erstentwickler variiert: Sie betrug bei der Entwicklung des Ektachrome 400 Diafilmes 6 min (Empfindlichkeit: 27 Din), 8 min (30 Din) und 11 Min (33 Din) bei periodischer Bewegung bei 39°C.

Die Densitometerkurven stellen direkte fotografische Reproduktionen dar. Das Joyce - Loeb - Mikrodensitometer registrierte hierfür auf transparentes Zeichenpapier. Nach Beschriftung und Montage auf Fotokarton wurden diese Originalkurven mit dem Leitz Reprovit II a abfotografiert.

Strichvorlagen wurden auf Agfaortho 25 Dokumentenfilm reproduziert, in Dokumol (Tetenal) entwickelt und mit Farmerschem Abschwächer (Tetenal) geklärt.

Schwarz-Weiß-Vergrößerungen wurden auf Ilfospeed (Ilford) Papier der Gradationen 5 (Strichvorlagen) und 2-3 (Immunfloreszenz- und Phasenkontrastaufnahmen) angefertigt.

Farbdias wurden direkt auf Cibachrome A Papier (Ciba Geigy) vergrößert und im Prozess P12 (Ciba Geigy) entwickelt.

LITERATURVERZEICHNIS

- Abbott, J., und H. Holtzer. 1968. Effect of 5-bromodeoxyuridine on chondrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 59: 1144 - 1151.
- Abbott, J., J. Schiltz, S. Dienstman, und H. Holtzer. 1974. The phenotypic complexity of myogenic clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 1506 - 1510.
- Adams, S.L., J.C. Alwine, B. de Crombrughe, und I. Pastan. 1979. Use of recombinant plasmids to characterize collagen RNAs in normal and transformed chick embryo fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 254: 4935 - 4938.
- Ahrens, P.B., M. Solursh, und R.S. Reiter. 1977. Stage related capacity for limb chondrogenesis in cell culture. *Dev. Biol.* 60: 69 - 82.
- Arbogast, B.W., M.Yoshimura, N.A.Kefalides, H. Holtzer, und A. Kaji. 1977. Failure of cultured chick embryo fibroblasts to incorporate collagen into their extracellular matrix when transformed by Rous Sarcoma virus. *J. Biol. Chem.* 252: 8863 - 8868.
- Bailey, A.J., G.B. Shellswoll, und V.C. Duance. 1979. Identification and change of collagen types in differentiating myoblasts and developing chick muscle. *Nature* 278: 67 - 68.
- Bauer, G. 1978. RNA-Tumoviren. *Naturw. Rundschau.* 11: 445-455.
- Benay, P.D., S.R. Padilla, und M.E. Nimni. 1977. The progeny of rabbit articular chondrocytes synthesize collagen types I, III and type I trimer, but not type II. Verifications by cyanogen bromide peptide analysis. *Biochemistry* 16: 865 - 872.
- Benay, P.D., S.R. Padilla, und M.E. Nimni. 1978. Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated functions in culture. *Cell* 15: 1313 - 1323.

- Blumberg, P.M., P.E. Driedger, und P.W. Rossow. 1976. Effect of a phorbol ester on a transformation-sensitive surface protein of chick fibroblasts. *Nature* 264: 446 - 447.
- Blumberg, P.M., und P.W. Robbins. 1975. Effect of proteases on activation of resting chick embryo fibroblasts and on cell surface proteins. *Cell* 6: 137 - 147.
- Bonner, W.M., und R.A. Laskey. 1974. A film detection method for tritium-labeled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* 46: 83 - 88.
- Bornstein, P., und J.F. Ash. 1977. Cell surface associated structural proteins in connective tissue cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 2480 - 2484.
- Bornstein, P., und W. Traub. 1979. The chemistry and biology of collagen. *The Proteins* 4: 411 - 632. (ed. H. Neurath). Academic Press, N.Y.
- Burgeson, R.E., F.A. El Adli, I.I. Kaitila, und D.W. Hollister. 1976. Fetal membrane collagens: Identification of two new collagen α chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73: 2579 - 2583.
- Burgeson, R.E., und D.W. Hollister. 1979. Collagen heterogeneity in human cartilage: Identification of several new collagen chains. *Bioch. Bioph. Res. Com.* 87: 1124 - 1131.
- Caplan, A.I. 1970. Effects of the nicotinamide-sensitive teratogen 3-acetyl pyridine on chick limb bud cells in culture. *Exp. Cell Res.* 62: 341 - 355.
- Caplan, A.I. 1976. A simplified procedure for preparing myogenic cells for culture. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 36: 175 - 181.
- Chacko, S., J. Abbott, S. Holtzer, und H. Holtzer. 1969. The loss of phenotypic traits by differentiated cells. VI. Behavior of the progeny of a single chondrocyte. *J. Exp. Med.* 130: 417 - 441.

- Chen, A. B., D.L. Amrani, und M.W. Mosesson. 1977. Heterogeneity of the cold-insoluble globulin of human plasma (Cig). A circulating cell surface protein. *Biochim. Bioph. Act.* 493: 310 - 322.
- Chen, L.B. 1977. Alterations in cell surface LETS protein during myogenesis. *Cell* 10: 393 - 400.
- Chen, L.B., A.Murray, R.A. Segal, A. Bushnell, und M.L.Walsh. 1978. Studies of intercellular LETS glycoprotein matrices. *Cell* 14: 377 - 391.
- Chevallier, A., M. Kieny, und A. Mauger. 1977. Limb-somite relationship: origin of the limb musculature. *J. Embryol. Exp. Morph.* 41: 245 - 258.
- Chiquet, M., E.C. Puri, und D.C. Turner. 1978. Attachment of chicken myoblasts to a gelatinized substratum is mediated by cell attachment protein from horse serum and by chicken fibroblast cell surface protein. *Ann. New York Acad. Sci.* 312: 420 - 422.
- Chiquet, M., E.C. Puri, und D.C. Turner. 1979. Fibronectin mediates attachment of chicken myoblasts to a gelatin-coated substratum. *J. Biol. Chem.* 254: 5475 - 5482.
- Chung, E., R.K. Rhodes, und E.J. Miller. 1976. Isolation of three collagenous components of probable basement membrane origin from several tissues. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 71: 1167 - 1174.
- Cohen, R., M. Pacifici, N. Rubinstein, J. Biehl, und H. Holtzer. 1977. Effect of a tumor promoter on myogenesis. *Nature* 266: 538 - 540.
- Conrad, G.W., W. Dessau, und K. von der Mark. 1980. Synthesis of type III collagen by fibroblasts from the embryonic cornea. *J. Cell Biol.* 84: 501 - 512.
- Coon, H.G. 1966. Clonal stability and phenotypic expression of chick cartilage cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 55: 66 - 73.

- David, G., und M. Bernfield. 1978. Collagen reduces glycosaminoglycan degradation by cultured mammary epithelial cells: Possible mechanism for basal lamina formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 786 - 790.
- DeClerck, Y.A., P.A. Jones und Jones. 1980. The effect of ascorbic acid on the nature and production of collagen and elastin by rat smooth-muscle cells. *Biochem. J.* 186: 217 - 225.
- Dehm, P., und D.J. Prockop. 1973. Biosynthesis of cartilage procollagen. *Eur. J. Biochem.* 35: 159 - 166.
- Delclos, K.B., und P.M. Blumberg. 1979. Decrease in collagen production in normal and Rous Sarcoma virus transformed chick embryo fibroblasts induced by phorbol myristate acetate. *Cancer Res.* 39: 1667 - 1672.
- Der, C.J., und E.J. Stanbridge. 1978. Lack of correlation between the decreased expression of cell surface LETS protein and tumorigenicity in human cell hybrids. *Cell* 15: 1241 - 1251.
- Dessau, W., B.C. Adelmann, R. Timpl, und G.R. Martin. 1978a. Identification of the sites in collagen α -chains that bind serum anti-gelatin factor (cold insoluble globulin). *Biochem. J.* 169: 55 - 59.
- Dessau, W., F. Jilek, B.C. Adelmann, und H. Hörmann. 1978b. Similarity of antigelatin factor and cold-insoluble globulin. *Biochim. Biophys. Acta.* 533: 227 - 237.
- Dessau, W., J. Sasse, R. Timpl, F. Jilek, und K. von der Mark. 1978c. Synthesis and extracellular deposition of fibronectin in chondrocyte cultures. *J. Cell Biol.* 79: 342 - 355.
- Dessau, W., H. von der Mark, K. von der Mark, und S. Fischer. 1980. Changes in the patterns of collagens and fibronectin during limb bud chondrogenesis. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 57: 51 - 60.

- Devlin, R.B., and C.P. Emerson. 1978. Coordinate regulation of contractile protein synthesis during myoblast fusion. *Cell* 13: 599 - 611.
- Diamond, L., T.G. O'Brien, und G. Rovera. 1978. Tumor Promoters: Effects on proliferation and differentiation of cells in culture. *Life Sci.* 23: 1979 - 1988.
- Dienstman, S.R., J. Biehl, H. Holtzer, und S. Holtzer. 1974. Myogenic and chondrogenic lineages in developing limb buds grown in vitro. *Dev. Biol.* 39: 83 - 95.
- Dienstman, S.R., und H. Holtzer. 1975. Myogenesis: A cell lineage interpretation. In: *Cell cycle and differentiation*, ed. J. Reinert und H. Holtzer, pp. 1 - 25. Berlin: Springer-Verlag.
- Driedger, P.E., und P.M. Blumberg. 1980. Specific binding of phorbol ester tumor promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 567 - 571.
- Duance, V.C., D.J. Restall, H. Beard, F.J. Bourne, und A. Bailey. 1977. The location of 3 collagen types in skeletal muscle. *FEBS Lett.* 79: 248 - 252.
- Engvall, E., und E. Ruoslahti. 1977. Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. *Int. J. Cancer* 20: 1 - 5.
- Epstein, E.H., T.T. Scott, E.J. Miller, und K.A. Piez. 1971. Isolation and characterization of the peptides derived from soluble human and baboon skin collagen after cyanogen bromide cleavage. *J. Biol. Chem.* 246: 1718 - 1724.
- Fessler, J.H., und L.I. Fessler. 1978. Biosynthesis of procollagen. *Ann. Rev. Biochem.* 47: 129 - 162.

- Fizman, M.Y., und P. Fuchs. 1975. Temperature-sensitive expression of differentiation in transformed myoblasts. *Nature* 254: 429 - 431.
- Furcht, L.T., D.F. Mosher, und G. Wendelschafer-Crabb. 1978. Immunocytochemical localization of fibronectin (LETS protein) on the surface of L6 myoblasts: light and electron microscopic studies. *Cell* 13: 263 - 271.
- Gauss, V. 1978. Kollagensynthese von Chondrozyten - Ein System zum Studium der Genexpression in Eukaryonten. Inaugural-Dissertation, Fachbereich Chemie-Pharmazie, München.
- Gold, L.I., A. Garcia-Pardo, B. Francione, E.C.Franklin, und E.Pearlstein. 1979. Subtilisin and cyanogen bromide cleavage products of fibronectin that retain gelatin-binding activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 4803 - 4807.
- Goldberg, B. 1977. Kinetics of processing of type I and type III procollagen in fibroblast cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 3322 - 3325.
- Gospodarowicz, D., D. Delgado, und I. Vladavsky. 1980. Permissive effect of the extracellular matrix on cell proliferation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 4094 - 4098.
- Hahn, L.-H.E., und K. Yamada. 1979. Identification and isolation of a collagen-binding fragment of the adhesive glycoprotein fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 1160 - 1163.
- Hamburger, V., und H.L. Hamilton. 1951. A series of normal stages in the normal development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88: 49 - 92.
- Hascall, V.C., und D. Heinegard. 1974. Aggregation of cartilage proteoglycans. I. The role of hyaluronic acid. *Journ. Biol. Chem.* 249: 4232 - 4241.
- Hassell, J.R., J.P. Pennypacker, H.K. Kleinmann, R.M. Pratt, und K.M. Yamada. 1979. Enhanced cellular fibronectin accumulation in chondrocytes treated with vitamin A. *Cell* 17: 821 - 826.

- Hassell, J.R., J.P. Pennypacker, und C.A. Lewis. 1978. Chondrogenesis and cell proliferation in limb bud cell cultures treated with cytosine arabinoside and vitamin A. *Exp. Cell Res.* 112: 409 - 417.
- Hauschka, S.D., und K. Konigsberg. 1966. The influence of collagen on the development of muscle clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 55: 119 - 126.
- Hecker, E. 1975. Co-carcinogens and Co-carcinogenesis. In: E. Grundmann (ed.), *Handbuch der allgemeinen Pathologie*, Vol. VI, Part 6, *Geschwülste/Tumors II*, pp. 439 - 484. New York: Springer Verlag, 1975.
- Hedman, K., M. Kurkinen, K. Alitalo, A. Vaheri, S. Johansson, und M. Høkk. 1979. Isolation of the pericellular matrix of human fibroblast cultures. *J. Cell Biol.* 81: 83 - 91.
- Hedman, K., A. Vaheri, und J. Wartiovaara. 1978. External fibronectin of cultured human fibroblasts is predominantly a matrix protein. *J. Cell Biol.* 76: 748 - 760.
- Herrman, H., W. Dessau, L.I. Fessler, und K. von der Mark. 1980. Synthesis of types I, III and AB₂ collagen by chick tendon fibroblasts in vitro. *Eur. J. Biochem.* 105: 63 - 74.
- Herrman, H., und K. von der Mark. 1975. Isolation and characterisation of type III collagen from chick skin. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 356: 1605 - 1612.
- Hewitt, A.T., H.K. Kleinman, J.P. Pennypacker, und G.R. Martin. 1980. Identification of an adhesion factor for chondrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 385 - 388.
- Ho, P.-L., D. Levitt, und A. Dorfman. 1977. A Radioimmune study of the effect of bromodeoxyuridine on the synthesis of proteoglycan by differentiating limb bud cultures. *Dev. Biol.* 55: 233 - 243.
- Holtzer, H. 1978. Cell lineages, stem cells and the "quantal" cell cycle concept. In: *Stem cells and tissue homeostasis*, ed. B. Lord, C. Potten, und P. Cole, pp. 1 - 27. Cambridge Press.

- Holtzer, H., und J. Abbott. 1968. Oscillations of the chondrogenic phenotype in vitro. In: Stability of the differentiated state. H. Ursprung, editor. Springer Verlag, Berlin. pp. 1-16.
- Holtzer, H., J. Biehl, G. Yeoh, R. Meganathan, und A. Kaji. 1975. Effect of oncogenic virus on muscle differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 4051 - 4055.
- Howard, B.H., S.L. Adams, M.E. Sobel, I. Pastan, und B. de Crombrughe. 1978. Decreased levels of collagen mRNA in Rous Sarcoma virus transformed chick embryo fibroblasts. J. Biol. Chem. 253: 5869 - 5874.
- Huang, D. 1974. Effect of extracellular chondroitin sulfate on cultured chondrocytes. J. Cell Biol. 62: 881 - 886.
- Hubbard, A.L., und Z.A. Cohn. 1972. The enzymatic iodination of the red cell membrane. J. Cell Biol. 55: 390 - 405.
- Hynes, O.H., und A. Destree. 1977. Extensive disulfide bonding at the mammalian cell surface. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74: 2855 - 2859.
- Hynes, R.O., A.T. Destree, M.E. Perkins, und D.D. Wagner. 1979. Cell surface fibronectin and oncogenic transformation. J. Supramolecular Struct. 11: 95-104.
- Hynes, R.O., G.S. Martin, M. Shearer, D.R. Critchley, und C.J. Epstein. 1976. Viral transformation of rat myoblasts: Effects on fusion and surface properties. Dev. Biol. 48: 35 - 46.
- Jilek, F., und H. Hörmann. 1978. Cold-insoluble globulin (fibronectin). IV. Affinity to soluble collagen of various types. Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 359: 247 - 250.
- Jilek, F., und H. Hörmann. 1979. Fibronectin (cold-insoluble globulin). VI. Influence of heparin and hyaluronic acid on the binding of native collagen. Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 306: 597 - 603.

- Kamine, J., und H. Rubin. 1977. Coordinate control of collagen synthesis and cell growth in chick embryo fibroblasts and the effect of viral transformation on collagen synthesis. *J. Cell Physiol.* 92: 1 - 12.
- Keski-Oja, J., M. Shoyab, J.E. De Larco, und G.T. Todaro. 1979. Rapid release of fibronectin from human lung fibroblasts by biologically active phorbol esters. *Int. J. Cancer*: 24: 218-224.
- Kessler, S.W., 1975. Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A - antibody adsorbent: Parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. *Journ. Immun.* 115: 1617 - 1624.
- Kessler, S.W. 1976. Cell membrane antigen isolation with the staphylococcal protein A - antibody adsorbent. *Journ. Immun.* 117: 1482 - 1490.
- Ketley, J.N., R.W. Orkin, und G.R. Martin. 1976. Collagen in developing chick muscle in vivo and in vitro. *Exp. Cell Res.* 99: 261 - 268.
- Klebe, R. 1974. Isolation of a collagen dependent cell attachment factor. *Nature (Lond.)* 250: 248 - 251.
- Kleinman, H.K., E.B. Mc Goodwin, und R.J. Klebe. 1976. Localization of the cell attachment region in types I and II collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72: 426 - 432.
- Konigsberg, I. 1963. Clonal analysis of myogenesis. *Science* 140: 1273 - 1284.
- Konigsberg, I. 1971. Diffusion-mediated control of myoblast fusion. *Dev. Biol.* 26: 132 - 152.
- Kosher, R.A., und R.L. Church. 1975. Stimulation of in vitro somite chondrogenesis by procollagen and collagen. *Nature* 258: 327-330.

- Kosher, R.A., J.W. Lash, und R.R. Minor. 1973. Environmental enhancement of in vitro chondrogenesis. IV. Stimulation of somite chondrogenesis by exogenous chondromucoprotein. *Dev. Biol.* 35: 210 - 220.
- Krieg, T., R. Timpl, K. Alitalo, M. Kurkinen, und A. Vaheri. 1979. Type III procollagen is the major collageneous component produced by a continous rhabdomyosarcoma cell line. *FEBS Letters* 104: 405 - 409.
- Kühn, K. 1969. The structure of collagen. *Essays Biochem.* 5: 99.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* 227: 680 - 685.
- Lambin, P. 1978. Reliability of molecular weight determination of proteins by polyacrylamide gradient gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Anal. Bioch.* 85: 114 - 125.
- Lash, J.W., und N.S. Vasan. 1978. Somite chondrogenesis in vitro. *Dev. Biol.* 66: 151 - 171.
- Laskey, T., und A. Mills. 1975. Quantitative film detection of ^3H and ^{14}C in polyacrylamide gels by fluorography. *Eur. J. Biochem.* 56: 335 - 341.
- Lavietes, B.B. 1970. Cellular interaction and chondrogenesis in vitro. *Dev. Biol.* 21: 584 - 610.
- Levinson, W., R.S. Bhathogar, und T. Liu. 1975. Loss of ability to synthesize collagen in fibroblasts transformed by Rous Sarcoma virus. *J. Natl. Cancer Inst.* 55: 807 - 810.
- Levitt, D., und A. Dorfman. 1972. The irreversible inhibition of differentiation of limb bud mesenchyme by bromodeoxyuridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 1253 - 1257.
- Levitt, D., und A. Dorfman. 1974. Concepts and mechanism of cartilage differentiation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 8: 103 - 149.

- Lewis, S.A., R.M. Pratt, J.P. Pennypacker, und J.R. Hassell. 1978. Inhibition of limb chondrogenesis in vitro by vitamin A: Alterations in cell surface characteristics. *Dev. Biol.* 64: 31 - 47.
- Linder, E., A. Vaheri, E. Ruoslahti, und J. Wartiovaara. 1975. Distribution of fibroblast surface antigen in the developing chick embryo. *J. Exp. Med.* 142: 41 - 49.
- Linsenmayer, T.F., B.P. Toole, und R.L. Trelstad. 1973. Temporal and spatial transitions in collagen types during embryonic chick limb development. *Dev. Biol.* 35: 232 - 239.
- Linsenmayer, T.T., R.L. Trelstad, und J. Gross. 1973. The collagen of chick embryonic notochord. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53: 39 - 45.
- Liotta, L.A., S. Abe, P.G. Robey, und G.R. Martin. 1979. Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 2268 - 2272.
- Lipton, B.H. 1977a. A fine-structural analysis of normal and modulated cells in myogenic cultures. *Dev. Biol.* 60: 26 - 47.
- Lipton, B.H. 1977b. Collagen synthesis by normal and bromodeoxyuridine-modulated cells in myogenic cultures. *Dev. Biol.* 61: 153 - 165.
- Little, C.D., und R.L. Church. 1978. A new type of collagen produced by mouse cells derived from early embryonic sources. *Arch. Bioch. Bioph.* 190: 632 - 639.
- Lowe, M.E., M. Pacifici, und H. Holtzer. 1978. Effects of phorbol-12-myristate-13-acetate on the phenotypic program of cultured chondroblasts and fibroblasts. *Cancer Res.* 38: 2350 - 2356.

- Mayne, R., und K.R. Strahs. 1974. Collagen synthesis by cultures of chick myotubes depleted of mononucleated cells. J. Cell Biol. 63: 212a.
- Mayne, R., M.S. Vail, und E.J. Miller. 1975. Analysis of changes in collagen biosynthesis that occur when chick chondrocytes are grown in 5-bromo-2-deoxyuridine. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 4511 - 4515.
- Mayne, R., M.S. Vail, und E.J. Miller. 1976a. The effect of embryo extract on the types of collagen synthesized by cultured chick chondrocytes. Dev. Biol. 54: 230 - 240.
- Mayne, R., M.S. Vail, P.M. Mayne, und E.J. Miller. 1976b. Changes in the type of collagen synthesized as clones of chick chondrocytes grow and eventually lose division capacity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73: 1674 - 1678.
- McConnell, M.R., P.M. Blumberg, und P.W. Rossow. 1978. Dimeric and high molecular weight forms of the large external transformation-sensitive protein on the surface of chick embryo fibroblasts. J. Biol. Chem. 253: 7522 - 7530.
- Meier, S., und M. Solursh. 1978. Ultrastructural analysis of the effect of ascorbic acid on secretion and assembly of extracellular matrix by cultured chick embryo chondrocytes. J. Ultrastruct. Res. 65: 48 - 59.
- Mikuni-Takagaki, Y., und B.P. Toole. 1979. Shedding of hyaluronate from the cell surface of Rous Sarcoma virus-transformed chondrocytes. J. Biol. Chem. 254: 8409 - 8415.
- Miller, E. 1976. Biochemical characteristics and biological significance of the genetically distinct collagens. Mol. Cell. Biochem. 13: 165 - 192.
- Miller, E.J., und V.A. Matukas. 1969. Chick cartilage collagen: A new type of $\alpha 1$ chain not present in bone or skin of the species. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73: 1674 - 1678.

- Minor, R.R. 1973. Somite chondrogenesis: A structural analysis. *J. Cell Biol.* 56: 27 - 50.
- Moscatelli, D., E. Jaffe, und D.B. Rifkin. 1980. Tetradecanoyl phorbol acetate stimulates latent collagenase production by cultured human endothelial cells. *Cell* 20: 343 - 351.
- Müller, P., C. Lemmen, S. Gay, K. von der Mark, und K. Kühn. 1975. Biosynthesis of collagen by chondrocytes in vitro. In: Extracellular matrix influences on gene expression, H.C.Slavkin, R.C. Greulich, eds., Academic Press, San Francisco. pp. 293-302.
- Müller, P., C. Lemmen, V. Gauss, S. Gay, und K. Kühn. 1977. Immunochemical and biochemical study of collagen synthesis by chondrocytes in culture. *Exp. Cell Res.* 108: 47 - 55.
- Muto, M., M. Yoshimura, M. Okayama, und A. Kaji. 1977. Cellular transformation and differentiation. Effect of Rous Sarcoma virus transformation on sulfated proteoglycan synthesis by chicken chondrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 4173 - 4177.
- Nathanson, M.A., S.R. Hilfer, und R.L. Searls. 1978. Formation of cartilage by non-chondrogenic cell types. *Dev. Biol.* 64: 99-117.
- Nevo, Z., und A. Dorfman. 1972. Stimulation of chondromucoprotein synthesis in chondrocytes by extracellular chondromucoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 2069 - 2072.
- Okayama, M., M. Pacifici, und H. Holtzer. 1976. Differences among sulfated proteoglycans synthesized in nonchondrogenic cells, presumptive chondroblasts, and chondroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73: 3224 - 3228.
- Olden, K., und K.M. Yamada. 1977. Mechanism of the decrease in the major cell surface protein of chick embryo fibroblasts after transformation. *Cell* 11: 957 - 969.

- Osbody, P., und Arnold Caplan. 1979. Osteogenesis in cultures of limb mesenchymal cells. *Dev. Biol.* 73: 84 - 102.
- Pacifici, M., D. Boettiger, K. Roby, und H. Holtzer. 1977. Transformation of chondroblasts by Rous Sarcoma virus and synthesis of the sulfated proteoglycan matrix. *Cell* 11: 891-899.
- Pacifici, M., und H. Holtzer. 1977. Effects of a tumor-promoting agent on chondrogenesis. *The American J. Anat.* 150: 207 - 212.
- Pastan, I., und M. Willingham. 1978. Cellular transformation and the "morphologic phenotype" of transformed cells. *Nature* 274: 645-650.
- Payette, R., J. Biehl, Y. Toyama, S. Holtzer, und H. Holtzer. 1980. Effects of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on the differentiation of avian melanocytes. *Cancer Res.* 40: 2465 - 2474.
- Pennypacker, J.P., J.R. Hassell, K.M. Yamada, und R.M. Pratt. 1979. The influence of an adhesive cell surface protein on chondrogenic expression in vitro. *Exp. Cell Res.* 121: 411 - 415.
- Perkins, M.E., T.H. Ji, und R.O. Hynes. 1979. Cross-linking of fibronectin to sulfated proteoglycans at the cell surface. *Cell* 16: 941 - 952.
- Perkins, R.C., A.H. Beth, L.S. Wilkerson, W. Serafin, L.R. Dalton, C.R. Park und J.H. Park. 1980. Enhancement of free radical reduction by eluated concentrations of ascorbic acid in avian dystrophic muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 790 - 794.
- Podleski, T.R., I. Greenberg, J. Schlessinger, K.M. Yamada. 1979. Fibronecin delays the fusion of L₆ myoblasts. *Exp. Cell Res.* 122: 317 - 326.
- Prockop, D.J., R.A. Berg, K.I. Kivirikko, und J. Uitto. 1976. Intracellular steps in the biosynthesis of collagen. In: *Biochemistry of collagen*, G.N. Ramachandran und A.H. Reddi, eds. Plenum Press, N.Y. pp. 163 - 274.

- Puri, E.C., M. Chiquet, und D.C. Turner. 1979. Fibronectin-independent myoblast fusion in suspension cultures. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 90: 883 - 889.
- Quigley, J.P. 1979. Phorbol ester-induced morphological changes in transformed chick fibroblasts: Evidence for direct catalytic involvement of plasminogen activator. *Cell* 17: 131 - 141.
- Reich, E. 1975. Plasminogen activator: Secretion by neoplastic cells and macrophages. In: *Proteases and biological control*, E.Reich, D.B. Rifkin, und E. Shaw, eds. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 333 - 342.
- Rhodes, R.K., and E.J. Miller. 1978. Physicochemical characterization and molecular organization of the collagen A and B chains. *Biochemistry* 17: 3442 - 3448.
- Rovera, G., T.G. O'Brien, und L. Diamond. 1977. Tumor promoters inhibit spontaneous differentiation of Friend erythroleukemia cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 2894 - 2898.
- Rowe, D.W., R.C. Moen, J.M. Davidson, P.H. Byers, P. Bornstein, und R.D. Palmiter. 1978. Correlation of procollagen mRNA levels in normal and transformed chick embryo fibroblasts with different rates of procollagen synthesis. *Biochemistry* 17: 1581 - 1590.
- Ruoslahti, E., E.G. Hayman, P. Kuusela, J.E. Shively, und E. Engvall. 1979. Isolation of a tryptic fragment containing the collagen binding site of plasma fibronectin. *J. Biol. Chem.* 254: 6054 - 6059.
- Sandmeyer, S., und P. Bornstein. 1979. Declining procollagen mRNA sequences in chick embryo fibroblasts infected with Rous Sarcoma virus. *J. Biol. Chem.* 254: 4950 - 4953.

- Sanger, J.W. 1974. The use of cytochalasin B to distinguish myoblasts from fibroblasts in cultures of developing chick striated muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71: 3621 - 3625.
- Searls, R. 1973. Chondrogenesis. In: *Developmental regulation*. S.J. Coward, ed., pp. 219 - 250. New York: Academic Press.
- Slavkin, H.C., und R.C. Greulich. 1975. *Extracellular matrix influences on gene expression*. New York: Academic Press.
- Schiltz, J.R., R. Mayne, und H. Holtzer. 1973. The synthesis of collagen and glycosaminoglycans by dedifferentiated chondroblasts in culture. *Differentiation*, 1: 97 - 107.
- Schwarz, R.I., und M.J. Bissell. 1977. Dependence of the differentiated state on the cellular environment: Modulation of collagen synthesis in tendon cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 4453 - 4457.
- Strudel, G. 1975. Control of the phenotypic vertebral cartilage differentiation by the periaxial extracellular material. In: Slavkin and Greulich: *Extracellular matrix influences on gene expression*. pp. 665 - 670. New York: Academic Press.
- Timpl, R. 1977. Struktur, Biosynthese und Immunologie des Kollagens. *Medizin in unserer Zeit*, 4: 119 - 126.
- Timpl, R., H. Rhode, P.G. Robey, S.I. Rennard, J.M. Foidart, und G.R. Martin. 1979. Laminin - a glycoprotein from basement membranes. *J. Biol. Chem.* 254: 9933 - 9937.
- Turner, D.C. 1978. Differentiation in cultures derived from embryonic chicken muscle. *Differentiation* 10: 81 - 93.
- Uitto, J., J.R. Lichtenstein, und E.A. Bauer. 1976. Characterization of procollagen synthesized by matrix-free cells isolated from chick embryo tendon. *Biochemistry* 15: 4935 - 4942.

- Uitto, J. 1977. Biosynthesis of type II collagen. Removal of amino- and carboxyterminal extensions from procollagen synthesized by chick embryo cartilage cells. *Biochemistry* 16: 3421 - 3429.
- Uitto, J., R.E. Allan, and K.L. Polak. 1979. Conversion of type II procollagen to collagen. *Eur. J. Biochem.* 99: 97 - 103.
- Urist, M.R., H. Iwata, P.L. Ceccotti, R.L. Dorfman, S.D. Boyd, R.M. McDowell, and C. Chien. 1973. Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70: 3511 - 3515.
- Vaheri, A., and E. Ruoslahti. 1974. Disappearance of a major cell-type specific surface glycoprotein antigen (SF) after transformation of fibroblasts by Rous Sarcoma virus. *Int. J. Cancer.* 13: 579 - 586.
- Vaheri, A., M. Kurkinen, V.P. Lehto, E. Linder, and R. Timpl. 1978. Codistribution of pericellular matrix proteins in cultured fibroblasts and loss in transformation: Fibronectin and procollagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 4944 - 4948.
- Vaheri, A., and E. Ruoslahti. 1975. Fibroblast surface antigen produced but not retained by virus-transformed cells. *J. Exp. Med.* 142: 530 - 535.
- Vertel, B.M., and A. Dorfman. 1978. An immunohistochemical study of extracellular matrix formation during chondrogenesis. *Dev. Biol.* 62: 1 - 12.
- Vertel, B.M., and A. Dorfman. 1979. Simultaneous Localization of type II collagen and core protein of chondroitin sulfate proteoglycan in individual chondrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 1261 - 1264.

- Von der Mark, K. 1978. Biochemical processes in cartilage and bone formation: Effect of collagen on the chondrogenic differentiation of somite and limb bud mesenchyme. 11th FEBS Meeting Copenhagen 1977. Vol. 48, B3 (ed. K.W. Kastrup und J.H. Nielsen) pp. 35-44.
- Von der Mark, K. 1980. Immunological studies on collagen type transition in chondrogenesis. *Curr. Top. Develop. Biol.* 14: 199 - 225.
- Von der Mark, K., und G.W. Conrad. 1979. Cartilage cell differentiation. *Clin. Orthopaed. Rel. Res.* 139: 185 - 205.
- Von der Mark, K., und H. von der Mark. 1977. Immunological and biochemical studies of collagen type transition during in vitro chondrogenesis of chick limb mesodermal cells. *J. Cell Biol.* 73: 736 - 747.
- Von der Mark, H., und K. von der Mark. 1979. Isolation and characterization of collagen A and B chains from chick embryos. *FEBS Letters* 99: 191 - 105.
- Von der Mark, K., V. Gauss, H. von der Mark, und P. Müller. 1977. Relationship between cell shape and type of collagen synthesized as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature (Lond.)* 267: 531 - 532.
- Von der Mark, H., K. von der Mark, und S. Gay. 1976a. Study of differential collagen synthesis during development of the chick embryo by immunofluorescence. I. Preparation of collagen type I and type II specific antibodies and their application to early stages of the chick embryo. *Dev. Biol.* 48: 237 - 249.
- Von der Mark, K., H. von der Mark, und S. Gay. 1976b. Study of differential collagen synthesis during development of the chick embryo by immunofluorescence. II. Localisation of type I and type II collagen during long bone development. *Dev. Biol.* 53: 153 - 170.

- Wartiovaara, J., I. Leivo, and A. Vaheri. 1979. Expression of the cell surface-associated glycoprotein, fibronectin, in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* 69: 247 - 257.
- West, C.M., R. Lanza, J. Rosenbloom, M. Lowe, and H. Holtzer. 1979. Fibronectin alters the phenotypic properties of cultured chick embryo chondroblasts. *Cell* 17: 491 - 501.
- Wyke, J.A. 1973. The selective isolation of temperature-sensitive mutants of Rous Sarcoma virus. *Virology* 52: 587 - 590.
- Yaffe, D. 1969. Cellular aspects of muscle differentiation in vitro. *Current Top. Develop. Biol.* 6: 183 - 224.
- Yamada, K.M., and K. Olden. 1978. Fibronectins - adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature* 275: 179 - 184.
- Yamada, K.M., S. Yamada, and I. Pastan. 1977. Quantitation of a transformation-sensitive, adhesive cell surface glycoprotein. *J. Cell Biol.* 74: 649 - 654.
- Yamasaki, H., E. Fibach, U. Nudel, I.B. Weinstein, R.A. Rifkin, and P.A. Marks. 1977. Tumor promoters inhibit spontaneous and induced differentiation of murine erythroleukemia cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 3451 - 3455.
- Yeoh, G.G.T., and H. Holtzer. 1977. The effect of cell density, conditioned medium and cytosin arabinoside on myogenesis in primary and secondary cultures. *Exp. Cell Res.* 104: 63 - 78.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Strukturveränderungen des Kollagen- und Fibronektinanteils der extrazellulären Matrix während der Knorpel- und Muskeldifferenzierung zu untersuchen. Hierzu wurden geeignete Zellkultursysteme etabliert, in denen sich *in vitro* mittels biochemischer und immunhistologischer Methoden die Synthese und Lokalisierung der Matrixkomponenten beobachten ließen. In allen untersuchten Entwicklungsmodellen konnte hierbei ein enger Zusammenhang zwischen dem Zelldifferenzierungszustand und der Struktur der extrazellulären Matrix aufgezeigt werden:

- 1) Embryonale Mesenchymzellkulturen differenzieren zu Knorpel, verbunden mit einem Übergang von Typ I auf Typ II Kollagensynthese. Die Zellen lagern dabei anfangs ein dichtes, extrazelluläres Geflecht von Typ I Kollagen/Fibronektin ab. Nach Einsetzen der Chondrogenese wird dieses Netzwerk abgebaut und durch die Komponenten der Knorpelmatrix ersetzt.
- 2) Differenzierte Chondrozyten, die *in vivo* kein Fibronektin mehr synthetisieren, nehmen nach dem Freisetzen aus der Knorpelmatrix die Fibronektinsynthese wieder auf. Fibronektin wird in Kolonien polygonaler Chondrozyten in Form kurzer, Zellen verbindender Fasern abgelagert. Mit der "Dedifferenzierung" zu fibroblastenähnlichen Zellen ist eine völlige Umstrukturierung der Matrix verbunden: Typ I, Typ III, Typ V Kollagen und Fibronektin bilden in "dedifferenzierten" Kulturen ein Netzwerk von langen, extrazellulären Fasern aus.
- 3) Die Differenzierung von einkernigen, spindelförmigen Muskelzellen ist von einer Änderung im Synthese- und Ablagerungsmuster der Matrixproteine begleitet. Einkernige Myoblasten reagieren mit Antikörpern gegen Typ I, Typ III, Typ V Kollagen und Fibronektin, vielkernige Muskelschläuche dagegen nur noch mit anti-Typ V Kollagen Antikörpern.

- 4) Das Kokarzinogen PMA unterdrückt die Chondrogenese von embryonalen Mesenchymzellen, die Rekonstitution der Knorpelmatrix differenzierter Knorpelzellen und die Muskeldifferenzierung. Damit verbunden ist eine starke Reduzierung der Synthese und der Ablagerung der Matrixproteine. Die PMA-Einwirkung ist reversibel: Nach Entfernen von PMA wird das normale Synthese- und Ablagerungsmuster der Matrixproteine wieder hergestellt und die Zelldifferenzierung eingeleitet.
- 5) Die Expression des transformierenden "src"-Genes in Kulturen Virus-infizierter Chondrozyten bzw. Myoblasten, gehalten bei der permissiven Temperatur (36°C), verhindert die Ausprägung des Knorpelphänotyps bzw. die Muskeldifferenzierung. Die Synthese und Ablagerung der Matrixproteine sind hierbei stark reduziert. Nach Überführen der Kulturen auf die nicht-permissive Temperatur (41°C) wird das normale Differenzierungsprogramm wieder eingeleitet. Das Muster der Matrixproteine von Knorpel- bzw. Muskelzellen gleicht jetzt dem nicht-infizierter Kulturen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die einen engen Zusammenhang zwischen dem Synthese- und Ablagerungsmuster der Komponenten der extrazellulären Matrix und dem Differenzierungsverhalten der Mesenchym- Knorpel- und Muskelzellen gezeigt haben, unterstützen die Vorstellung, nach der die extrazelluläre Matrix einen Einfluß auf die Zelldifferenzierung ausübt.

LEBENS LAUF

Joachim Sasse

geboren am 6. April 1951 in Berlin (West)

Eltern: Werner Sasse, Lehrer

Gisela Sasse, Lehrerin

Schulbildung

1957 - 1961 Volksschule Hermann - Boddin, Berlin (West)

1961 - 1963 21. Grundschule, Berlin (West)

1963 - 1970 Albert - Schweitzer - Gymnasium, Berlin (West)

Abschluß mit dem Abitur im Januar 1970

Bundessieger im Wettbewerb "Jugend forscht" im März 1970 mit einer Arbeit zum Thema "Gelpermeationschromatographie von Polystyrolen"

Studium

ab SS 1970 Studium der Chemie an der Freien Universität Berlin

ab SS 1971 Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes

Vordiplom im September 1972

ab WS 1972/73 Studium der Chemie (Wahlfach: Biochemie) an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Hauptdiplom im September 1975

Oktober 1975 - Dezember 1976 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München, Arbeitsgruppe Zellbiologie (Leiter: Prof. Ulrich Grossbach) zum Thema: "Untersuchungen zur Struktur der Sekretproteine in den Speicheldrüsen von Chironomus".

Januar 1977 - März 1980 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung für Bindegewebsforschung (Leiter: Prof. Klaus Kühn)

Eheschließung

im Februar 1978 mit Jutta Brügel-Sasse, Lehrerin

Geburt von Julian Paul David Sasse im April 1978

Geburt von Justus Karl Patrick Sasse im Oktober 1979

